

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Nebojša Vujnović

**Kombinirani učinak inhibitora tirozin
kinaza i protutumorskih lijekova u
stanicama melanoma čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov, znanstvene savjetnice Instituta Ruđer Bošković, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar molekularne biologije.

Najveću zahvalu upućujem Andreji - iznimnoj osobi, odličnoj mentorici i izvrsnoj znanstvenici. Ogromna potpora, razumijevanje i strpljenje koje mi je ukazala učinili su cijelo iskustvo vrlo ugodnim, a ovaj rad mogućim. Njezin pristup prema radu obilježio me kao budućeg znanstvenika, dok me njen pristup prema ljudima obilježio kao osobu.

Od srca zahvaljujem i Anama, Anamariji, Dragomiri, Ivani, Maji, Mladenu, Nini, Sanjici i Tihani na dostupnosti, pristupačnosti, ugodnoj radnoj atmosferi, dobrom društvu te nesebičnom dijeljenju znanja i životnog iskustva.

Zahvaljujem i svojim dragim prijateljima...

Leoni i Lidiji, na dugogodišnjem prijateljstvu i „terapijama“ kad god su bile potrebne.

Ivi, Kristini, Leoni, Mariu, Petri i Tamari, na tome što što su i dosadna predavanja učinili zabavnim, a svaki izlazak nezaboravnim.

Anamariji i Vladi, na odličnom smislu za humor i na ugodnom društvu za ručkom.

Matiji, na tome što je dobar i savjestan vozač.

Anji, Frani i Martini, na dugim telefonskim razgovorima i dijeljenju nevolje.

Posebno zahvaljujem obitelji, pogotovo roditeljima, na podršci u svakom smislu te riječi.

Ovaj rad posvećujem Luki, Nataši, Tamari, Uni i Dunji. Vi ste moji idoli.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

KOMBINIRANI UČINAK INHIBITORA TIROZIN KINAZA I PROTUTUMORSKIH LIJEKOVA U STANICAMA MELANOMA ČOVJEKA

Nebojša Vujnović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Stanice melanoma čovjeka izrazito su otporne na djelovanje protutumorskih lijekova. Stoga je važno razviti nove terapije, a jedna od njih je ciljana terapija inhibitorima tirozin kinaza i mogućnost njihove kombinacija s protutumorskim lijekovima. Stoga je u ovom radu na modelu četiri stanične linije melanoma čovjeka istražena mogućnost liječenja melanoma kombinacijom dasatiniba s protutumorskim lijekovima paklitakselom, vinkristinom ili cisplatinom. Preživljenje stanica nakon izlaganja navedenim spojevima ili njihovim kombinacijama određeno je testom MTT, dok je računanjem kombinacijskog indeksa procijenjen zajednički učinak. Pokazano je da su stanice RPMI-7951 i MeWo osjetljive na paklitaksel, vinkristin i cisplatinu, za razliku od stanica SK-MEL-3 koje pokazuju otpornost na sva tri protutumorska lijeka i stanica A375 koje su otporne na paklitaksel i vinkristin, a osjetljive na cisplatinu. Stanice RPMI-7951 pokazale su se osjetljivim na dasatinib, a njegova kombinacija sa paklitakselom, vinkristinom i cisplatinom daje antagonistički učinak. Kod stanica A375 uočena je slaba osjetljivost na dasatinib, a kombinacija sa cisplatinom pokazala je sinergistički učinak. Na temelju određivanja količine Src/pSrc(Y418) metodama SDS-PAGE i Western blot i rezultata preživljenja nakon utišavanja kinaze Src u stanicama RPMI-7951 zaključeno je da pSrc(Y418) nije meta dasatiniba te da su potrebna daljnja istraživanja u cilju otkrivanja biomarkera za predviđanje osjetljivost stanica melanoma na dasatinib.

(61 stranica, 17 slika, 11 tablica, 68 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: melanom, pSrc(Y418), dasatinib, cisplatin, paklitaksel, vinkristin

Voditelj: dr. sc. Andreja Ambriović Ristov, znanstvena savjetnica

Suvoditelj: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Inga Marijanović, doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc. dr. sc.

Tomislav Ivanković

Zamjena: doc. dr. sc. Petra Korać

Rad prihvaćen: 16. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

COMBINED EFFECT OF TYROSINE KINASE INHIBITORS AND ANTITUMOR DRUGS IN HUMAN MELANOMA CELLS

Nebojša Vujnović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Human melanoma cells are highly resistant to antitumor drugs. Therefore, it is important to develop new therapies such as targeted therapy with tyrosine kinases inhibitors, as well as combining those inhibitors with antitumor drugs. In this research the potential of treating melanoma with the combination of dasatinib and antitumor drugs paclitaxel, vincristine or cisplatin in four human melanoma cell lines was investigated. Cell survival was determined by MTT test, and combined effect was assessed by calculation of combination index. Cell lines RPMI-7951 and MeWo were shown to be sensitive to paclitaxel, vincristine and cisplatin, SK-MEL-3 cells were shown to be resistant, while A375 cells were shown to be resistant to paclitaxel and vincristine but sensitive to cisplatin. RPMI-7951 cells demonstrated sensitivity to dasatinib, and its combination with paclitaxel, vincristine and cisplatin was shown to have antagonistic effect. A375 cells demonstrated a mild sensitivity to dasatinib, and its combination with cisplatin was shown to have a synergistic effect. On the basis of the amount of Src/pSrc(Y418) determined by SDS-PAGE and Western blot and the survival of RPMI-7951 cells upon silencing Src kinase, it is concluded that pSrc(Y418) is not a dasatinib target, emphasizing the need for identification of biomarkers that might predict sensitivity to dasatinib in melanoma cells.

(61 pages, 17 figures, 11 tables, 68 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central biological library

Key words: melanoma, pSrc(Y418), dasatinib, cisplatin, paclitaxel, vincristine

Supervisor: Andreja Ambriović Ristov, PhD, Senior Scientist

Assistant supervisor: Inga Marijanović, PhD, Asst. Prof.

Reviewers: Inga Marijanović, PhD, Asst. Prof., Sofia Ana Blažević, PhD, Asst. Prof., Tomislav Ivanković, PhD, Asst. Prof.

Replacement: Petra Korać, PhD, Asst. Prof.

Thesis accepted: February 16th, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Tumori.....	1
1.1.1. Liječenje tumora.....	2
1.2. Melanom.....	4
1.2.1. Genska obilježja melanoma.....	5
1.2.1.1. Obiteljski melanom.....	5
1.2.1.2. Sporadični melanom.....	6
1.2.2. Liječenje melanoma	9
1.2.2.1. Klasična terapija.....	9
1.2.2.1.1. Paklitaksel.....	10
1.2.2.1.2. Vinkristin.....	11
1.2.2.1.3. Cisplatina.....	11
1.2.2.2. Novi oblici terapija	11
1.2.2.2.1. Ciljanja terapija.....	12
1.2.2.2.1.1. Dasatinib.....	16
1.2.2.2.1.2. PP2.....	17
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Materijali	19
3.1.1. Osnovne kemikalije.....	19
3.1.2. Stanične linije.....	20

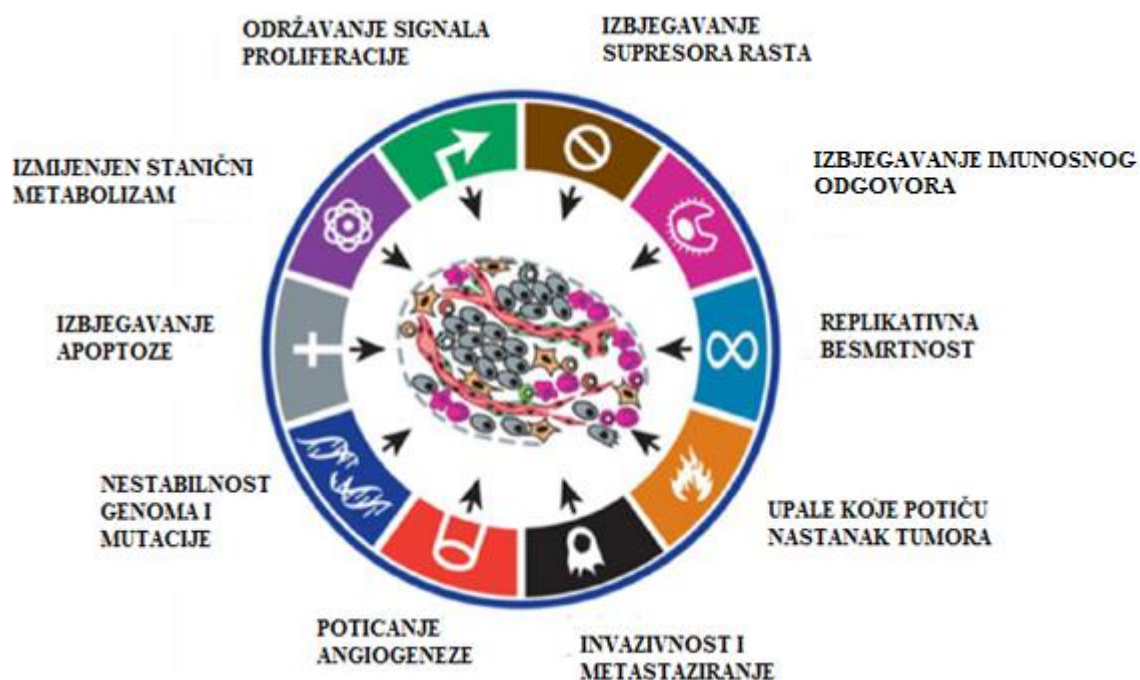
3.1.3. Protutijela	20
3.1.4. Priprema pufera i otopina	21
3.1.5. Uređaji i ostali materijali	22
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi	24
3.2.2. Presađivanje stanica	24
3.2.3. Utišavanje gena	24
3.2.4. Određivanje preživljenja stanica testom MTT	25
3.2.5. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE.....	27
3.2.6. Analiza proteina metodom Western blot.....	28
3.2.7. Računanje kombinacijskog indeksa (CI).....	29
4. REZULTATI.....	30
4.1. Stanične linije melanoma imaju različitu osjetljivost na vinkristin, paklitaksel i cisplatinu	30
4.2. Stanična linija melanoma RPMI-7951 osjetljiva je na dasatinib za razliku od staničnih linija melanoma SK-MEL-3, MeWo i A375.....	35
4.3. Stanična linija melanoma RPMI-7951 nije osjetljiva na PP2	37
4.4. Istovremeno izlaganje stanica RPMI-7951 dasatinibu i protutumorskim lijekovima pokazuje antagonistički učinak	38
4.5. Istovremeno izlaganje stanica A375 dasatinibu i cisplatinu pokazuje sinergistički učinak.....	41
4.6. Utvrđivanje ukupne količine pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951 osjetljivim na dasatinib	42
4.7. Utišavanje ekspresije Src u stanicama RPMI-7951 ne imitira učinak dasatiniba na osjetljivost na protutumorske lijekove	44

5. RASPRAVA.....	47
6. ZAKLJUČCI.....	55
7. LITERATURA.....	56
8. ŽIVOTOPIS.....	61

1. UVOD

1.1. Tumori

Tumor je moguće definirati kao abnormalan rast tkiva do kojeg dolazi zbog nekontroliranog dijeljenja stanica. Tijekom postupne pretvorbe normalnih stanica u tumorske, one stječu nova obilježja i sposobnosti koje ih s vremenom čine tumorogenim, a naposljetku i malignim. Za tumorske stanice karakterističan je nekontroliran rast, izbjegavanje stanične smrti i imunosnog odgovora organizma, poticanje angiogeneze i invazivnost. Osnovni mehanizam kojim stanice stječu te nove sposobnosti su mutacije (slika 1) (Hanahan i Weinberg 2011).



Slika 1. Osobine tumora prema Hanahanu i Weinbergu. Tumorske stanice rastu nekontrolirano. Razlog tomu je mogućnost dijeljenja bez prisutnih faktora rasta i neosjetljivost na inhibitore rasta. Te stanice imaju sposobnost izbjegavanja apoptoze i imunosnog odgovora. Njihov nastanak potiču nestabilnost genoma, mutacije i upale, a preživljavanje u anaerobnom okolišu omogućava im izmjena vlastitog metabolizma. Mogućnost poticanja angiogeneze ključan je faktor u metastaziranju tumora. Preuzeto i prilagođeno prema Hanahan i Weinberg (2011).

Onkogeni i tumor supresori dvije su glavne skupine gena koje igraju ulogu u tumorogenezi. Onkogeni su geni čija povećana aktivnost, bilo mutacijom, povećanom ekspresijom ili translokacijom, potiče stvaranje i napredovanje tumora. Za aktivaciju onkogena dovoljna je mutacija u samo jednom alelu. Proteini koje kodiraju tumor supresori igraju ulogu u inhibiciji nastanka i rasta tumora. Mutacije u ovim genima uzrokuju gubitak njihove funkcije, a uglavnom se moraju dogoditi u oba alela da bi imale učinak (Pecorino 2012).

1.1.1. Liječenje tumora

Cilj je terapije tumora spriječiti proliferaciju tumorskih stanica i ubiti postojeće. Pri osmišljavanju novih strategija liječenja najvažnije je postići optimalan učinak uz minimalne nuspojave. Svi protutumorski lijekovi prije nego dospiju na tržište moraju proći stroga predklinička i klinička ispitivanja.

Tri su glavna pristupa u liječenju tumora: kirurški zahvat, radioterapija i kemoterapija. Kirurški zahvat najčešći je izbor za uklanjanje primarnih tumora. Ako se primarni tumor u potpunosti odstrani prije nego što je došlo do stvaranja metastaza, dolazi do potpunog oporavka pacijenta. Radioterapija je tretman koji uključuje visokoenergetsko zračenje, a često se koristi kod pacijenata s neoperabilnim tumorima. Glavna prednost ove vrste terapije mogućnost je lokalne primjene što smanjuje oštećenja zdravog tkiva (<http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types/radiation-therapy/radiation-fact-sheet>).

Kemoterapija je oblik liječenja tumora koji podrazumijeva unos jednog ili više protutumorskih lijekova u organizam. Sve su klasične kemoterapije neselektivne, djeluju na sve stanice u organizmu koje proliferiraju, a dijele se na inhibitore sinteze DNA, spojeve koji oštećuju DNA i spojeve koji ometaju diobu stanica. Inhibitori sinteze DNA strukturni su analozi heterocikličkih baza ili spojevi koji ometaju metabolizam folata čime inhibiraju glavne korake stvaranja purinskih i pirimidinskih baza te nukleotida. Spojevi koji oštećuju DNA rade to umetanjem metilnih ili alkilnih skupina između nukleotidnih baza što dovodi do neispravnog sparivanja baza, nakupljanja mutacija, fragmentacije DNA, te u konačnici inhibicije replikacije i transkripcije DNA. U ovu skupinu spadaju i spojevi koji stabiliziraju vezu DNA i topoisomeraza I i II, te tako uzrokuju oštećenje DNA. Spojevi koji ometaju diobu stanica

inhibiraju polimerizaciju tubulina ili stabiliziraju mikrotubule te tako izazivaju apoptozu u stanicama (Pecorino 2012).

Iako su mehanizmi djelovanja protutumorskih lijekova vrlo različiti, njihov konačan cilj je isti – izazvati apoptozu u stanicama tumora. Međutim, ovi lijekovi imaju i nekoliko zajedničkih negativnih karakteristika. Zbog njihovog neselektivnog djelovanja dolazi do oštećenja svih stanica u diobi, a posljedično i mnogih neželjenih pojava. Nuspojave uzrokovane kemoterapijom uključuju mijelosupresiju, usporeno zacjeljivanje rana, gubitak kose, oštećenje epitela probavnog sustava, mučninu i povraćanje, umor, depresiju i sterilnost (Shapiro i Recht 2001). Iako većina ovih nuspojava nestaje ubrzo nakon prestanka liječenja, može doći i do trajnih oštećenja pojedinih organa. Glavni je uzrok neuspješne kemoterapije otpornost tumorskih stanica na protutumorske lijekove, bilo da se radi o urođenoj ili stečenoj otpornosti. Upravo se iz tih razloga danas intenzivno radi na osmišljavanju novih načina liječenja tumora. Neki od tih novih pristupa uključuju imunoterapiju, hormonsku terapiju te ciljanu i gensku terapiju (Luqmani 2005).

Imunoterapija potiče komponente imunosnog sustava na borbu protiv tumora, a omogućuje ju postojanje specifičnih molekula (antigena) na površini stanica tumora koje nisu prisutne na normalnim stanicama (Ito i Chang 2013). Hormonska terapija ograničena je na tumore ovisne o hormonima, a prednosti su joj selektivnost, učinkovitost, mala toksičnost i niska cijena. Ova vrsta terapije ima najvažniju primjenu i najbolje proučene mehanizme djelovanja u liječenju karcinoma dojke i prostate. U genskoj terapiji tumora, koja još uvijek nije u rutinskoj kliničkoj primjeni, koristi se nekoliko različitih strategija, a najčešće istraživane su pojačavanje imunosnog odgovora na tumorske antigene, nadomještanje mutacija prisutnih u tumoru, supresija ekspresije onkogeni, kočenje angiogeneze, unošenje gena samoubojica ili infekcija onkolitičkim virusima (Ortiz i sur. 2012).

Ciljana terapija koristi specifične molekule koje se vežu i time blokiraju aktivnost ciljnih molekula odgovornih za rast, progresiju i širenje tumora. Mehanizmi kojima se to postiže su induciranje apoptoze, inhibicija specifičnih enzima i receptora faktora rasta uključenih u proliferaciju, mijenjanje funkcija proteina koji reguliraju ekspresiju gena ili druge funkcije u stanici. Uz ovu vrstu terapije često se veže pojam personalizirane medicine čiji su ciljevi na temelju molekularnih markera osmisлити specifičan tretman za svakog pacijenta (Joo i sur. 2013).

Dvije su kategorije ciljane terapije; terapija malim molekulama (manjim od 800 Da) i terapija monoklonskim protutijelima. Male molekule dizajnirane su tako da mogu lako proći kroz membranu stanice i doprijeti do ciljne molekule u stanici. S obzirom na to da većina monoklonskih protutijela ne može proći kroz membranu stanice, njihove mete većinom se nalaze izvan stanice ili na njenoj površini. Ime same terapije daje predodžbu o njenoj funkciji. Sukladno tome, male molekule koje imaju nastavak "-ib" imaju inhibitorna svojstva, a mnoge od tih molekula razvijene su kao inhibitori tirozinskih kinaza. Imena monoklonskih protutijela imaju nastavak "-mab" (Joo i sur. 2013).

Većina ciljanih lijekova uspijeva ipak samo produžiti život pacijenata, ali ne i izliječiti ih od bolesti. Razlog tomu je heterogenost unutar tumora koja je posljedica mutacija koje se nakupljaju u stanicama tumora svakog pacijenta. U tumorima se nalazi populacija stanica koja je otporna na kemoterapiju i uzrok je ponovnog pojavljivanja tumora. Te se stanice nazivaju tumorske inicijacijske stanice ili matične stanice tumora. Identifikacija tih stanica u tumoru i opisivanje njihovih biomarkera prvi je korak u razvoju novih učinkovitijih ciljanih terapija. S aspekta personalizirane medicine heterogenost tumora svakog pacijenta trebala bi biti uzeta u obzir kod odabira terapije jer ciljane terapije mogu imati učinak samo kad je dobro poznata genetika tumora na koji se primjenjuju (Joo i sur. 2013).

Ciljane terapije protiv onkogenih proteina ima neporeciv klinički učinak. Međutim, i u ovom slučaju redovito dolazi to stvaranja otpornosti tumora na njihovo djelovanje. Iz tog se razloga ciljane terapije kombiniraju međusobno, ali i sa nekim od klasičnih protutumorskih lijekova.

1.2. Melanom

Melanom je vrsta tumora kože koja nastaje iz melanocita, stanica koje proizvode pigment melanin, a nalaze se u bazalnom sloju epiderme. Nastaje zbog nepopravljenih oštećenja DNA, najčešće uzrokovanih ultraljubičastim (UV) zračenjem koje potječe od Sunca ili solarija, ali na njegov nastanak utječe i genetička predispozicija. Često nalikuje madežima, a neki upravo od njih i nastaju. Ako se melanom rano otkrije gotovo je uvijek izlječiv, no ako metastazira prognoza je značajno lošija. Incidencija na 100 000 stanovnika SAD-a iznosi 21,3 novootkrivenih slučajeva godišnje što predstavlja 4,6% svih tumora. Procjenjuje se da u SAD-

u godišnje od ove bolesti oboli preko 75 000 ljudi, a desetak tisuća ljudi premine (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>).

Kod žena se melanom najčešće javlja na nogama, a kod muškaraca na leđima. Najčešći je kod bijelaca, pogotovo kod Europljana koji žive na sjeveru kontinenta, no čest je i kod osoba koje žive u Južnoj i Sjevernoj Americi te južnoj Africi i Australiji. Razlog ovoj geografskoj raspodjeli leži u kombinaciji izloženosti ultraljubičastom zračenju i pigmentaciji kože ljudi koji žive na tom području (Parkin i sur. 2005).

Rani znakovi melanoma su promjene boje i oblika postojećih madeža ili nastanak izraslina na koži. U kasnijim fazama madež može svrbjeti ili krvariti. Metastatski melanomi mogu uzrokovati nespecifične simptome kao što su gubitak apetita, mučnina, povraćanje i umor. Rano metastaziranje melanoma je moguće, ali je relativno rijetko. Kod ove vrste tumora naročito su česte metastaze na jetri, mozgu, kostima, abdomenu i udaljenim limfnim čvorovima (Fiddler 1995). Kao prognostički faktor često se koristi procjena do koje su se dubine tumorske stanice proširile u koži (Cho i Chiang 2010). Kod određivanja stadija tumora gleda se veličina tumora (koja se određuje klasifikacijom po Breslowu), je li tumor probio bazalnu membranu i je li se proširio na limfne čvorove i ostale organe (Mandala i Massi 2014).

1.2.1. Genska obilježja melanoma

1.2.1.1. Obiteljski melanom

Mnogobrojne studije provedene zadnjih desetljeća ukazuju na to da postoji veza između pojedinih gena i sklonosti razvoju melanoma. Fizičke karakteristike poput svijetlog tena, nemogućnosti tamnjenja, crvene kose, plavih očiju te prisutnost pjegica i atipičnih madeža koreliraju s povećanim rizikom nastanka melanoma. Jedan od najvećih faktora rizika je učestalo pojavljivanje melanoma u obitelji pa u tom slučaju govorimo o obiteljskom ili nasljednom melanomu. Za ovu vrstu melanoma karakteristični su višestruki slučajevi u obitelji, pojavljivanje više primarnih melanoma na istoj osobi te njihovo rano nastajanje. Obiteljski melanom predstavlja 8–12% svih melanoma (Marzuka-Alcala i sur. 2014).

Jedan od prvih gena za koji je dokazana povezanost s nastankom melanoma je *CDKN2A* na kromosomu 9p21. Ovaj je gen privukao pažnju znanstvenika zbog česte homozigotne

delecije u stanicama brojnih tumora pa tako i melanoma. Zahvaljujući mogućnosti pomaka okvira čitanja ovaj gen kodira 2 proteina, INK4A i ARF. INK4A, poznatiji kao p16, inhibira ciklin ovisnu kinazu 4/6 (CDK4/6) koja je zadužena za ulazak u S fazu staničnog ciklusa (Chin 2003). Gubitak funkcije ovog proteina dovodi do nekontroliranog dijeljenja stanica. Protein ARF, odnosno p14, onemogućuje ubikvitinaciju i degradaciju p53 što znači da su oba proteina tumor supresori. INK4A je mutiran u 25-40% nasljednih i 0,2-2% sporadičnih melanoma. Česte su i mutacije proteina CDK4, kinaze proteina Rb. Posljedica mutacija ovog proteina je nemogućnost inhibicije proteinom INK4A, a samim time i njegova stalna aktivnost. Iako je kod većine solidnih tumora p53 inaktiviran kod melanoma to najčešće nije slučaj, a mutacija gena *MDM2*, koji kodira istoimeni negativni regulator p53, događa se u samo 3-5% slučajeva (Chin i sur. 2006).

U nastanku melanoma otkrivena je i uključenost gena za receptor melanokortina 1 (MC1R), smještenog na kromosomu 16q24.3. Ovaj se gen povezuje i uz tipičan visokorizičan fenotip (crvena kosa, blijeda put, sklonost sunčanim pjegama i nemogućnost tamnjenja kože) te pokazuje izrazit polimorfizam kod ljudi. MC1R je transmembranski protein, a eksprimiran je u melanocitima epidermisa. Ligand ovog receptora je hormon MSH (engl. *melanocyte-stimulating hormone*), a interakcija ovih dviju molekula ključna je za pigmentaciju sisavaca. Dva su tipa melanina prisutna u koži čovjeka, feomelanin i eumelanin. Dok eumelanin štiti od ultraljubičastog zračenja, feomelanin, osim što ima smanjenu sposobnost zaštite od UV-a, ujedno stvara i slobodne radikale. Osobe s navedenim fenotipom pokazuju smanjenu sposobnost sinteze eumelanina što bi mogao biti razlog smanjenje sposobnosti obrane epidermisa od UV oštećenja kod tih ljudi (Chin 2003). Istina je da polimorfizam ovog gena određuje tip pigmentacije, ali pojačani rizik od razvoja melanoma ne može se potpuno pripisati samom polimorfizmu. Moguće je da genske varijante gena MC1R modificiraju penetrantnost mutacija drugoga genskog lokusa – *CDKN2A* (Box i sur. 2001).

1.2.1.2. Sporadični melanom

Većina mutacija navedenih kod obiteljskih melanoma prisutna je i u sporadičnim ili nenasljednim melanomima, ali s puno nižom incidencijom. Iz tog razloga moraju postojati dodatni geni koji sudjeluju u razvoju melanoma. Brojna istraživanja melanoma predlažu razne

kandidate za ulogu u nastanku i progresiji melanoma, ali činjenica je da mnoge komponente tog procesa još uvijek nisu poznate.

Signalni put MAPK (engl. *mitogen-activated-protein kinase*) vrlo je važan u nastanku melanoma. Ključne molekule uključene u ovaj put prijenosa signala su RAS, RAF i ERK (slika 2). Signal počinje vezanjem liganda za receptorsku tirozinsku kinazu (RTK) na površini stanice što potiče konformacijsku promjenu u receptoru i aktiviranje porodice protoonkoproteina RAS (NRAS, HRAS i KRAS) koji dalje aktiviraju porodicu serin/treoninskih kinaza RAF (c-RAF1, BRAF i ARAF) poznatijih pod imenom MAPK kinaznih kinaza (MKKK). RAF u konačnici aktivira i kinaze ERK1 i ERK2. Iako ih se primarno povezuje s pojačanim dijeljenjem stanica, ERK proteini su odgovorni i za diferencijaciju, senescenciju i preživljavanje stanica. ERK proteinske kinaze mogu fosforilirati enzime koji reguliraju metabolizam ili citoskeletne proteine koji određuju oblik stanice i migraciju. U jezgri reguliraju ekspresiju gena fosforilacijom transkripcijskih faktora i drugih proteinskih kinaza (Cheng i sur. 2013).

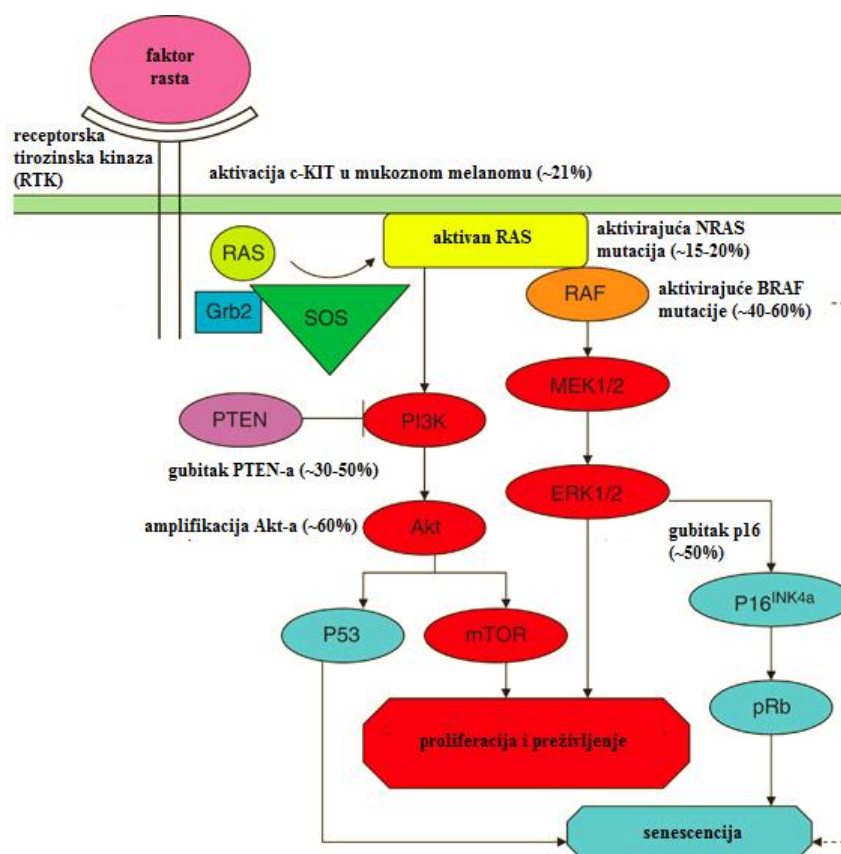
Aktivirajuće mutacije gena *RAS* otkrivene su u melanomu. Učestalost tih mutacija je relativno niska (10–15%), ali konstantno su prisutne. N-RAS je najčešće mutiran član obitelji RAS u melanocitima. Aktivirajuće mutacije ovog proteina koreliraju s izlaganjem suncu. U melanomu se nekad mogu primijetiti i mutacije H-RAS, a mutacije K-RAS u njemu do sad nisu opisane. Aktiviran H-RAS u kombinaciji s inaktivirajućim mutacijama u INK4A, ARF i/ili p53 uzrokuje nastanak nemetastatskog melanoma. S druge strane, aktivacija N-RAS i deaktivacija INK4A/ARF potiču nastanak agresivnog metastatskog melanoma (Chin i sur. 2006).

Aktivirajuće mutacije BRAF općenito su najčešća promjena u ljudskim melanomima. Javljaju se u više tipova tumora, ali najveću incidenciju imaju u melanomu (zabilježene u 66% slučajeva) (Davies i sur. 2002). U tom se proteinu događaju specifične točkaste mutacije u kinaznoj aktivacijskoj domeni (V600E), a uzrokuju konstitutivnu aktivaciju proteina. Mutirani BRAF se ne pojavljuje kao nasljedna predispozicija. Visoka stopa pojavljivanja mutacija ovog gena i poznata epidemiološka poveznica melanoma i ultraljubičastog zračenja potiče sumnju da je mutacija BRAFV600E inducirana UV oštećenjem. Ovoj se pretpostavci protivi činjenica da se transverzija T → A, koja uzrokuje mutaciju valina u glutaminsku kiselinu na mjestu broj 600 (V600E), ne može povezati s karakterističnim oštećenjima uzrokovanim UV zračenjem. No, mutacije se pojavljuju u 59% slučajeva melanoma na koži koja je direktno izložena suncu, a nastaju u puno manjem postotku u melanocitima koji sunčevim zrakama nisu bili direktno izloženi. Pokusima *in vitro* je pokazano da ekspresija BRAFV600E u melanocitima uzrokuje

zaustavljanje staničnog ciklusa. Iako mu je pripisana uloga u inicijaciji transformacije melanocita, on sam nije dovoljan da do nastanka tumora i dođe (Chin i sur. 2006).

U razvoju melanoma primijećena je i pojačana signalizacija receptora tirozinskih kinaza (RTK) koja se većinom temelji na promjeni razine ekspresije, iako u nekim slučajevima dolazi do amplifikacije gena. Melanomi koji se nalaze u kasnijem stadiju često imaju pojačano eksprimiran gen za receptor epidermalnog faktora rasta (EGFR). Ipak, u melanomu nisu pronađene mutacije EGFR-a, inače često prisutne u drugim vrstama tumora. EGFR je važan za preživljavanje stanica tumora preko PI3K-ovisne aktivacije AKT-a (Chin i sur. 2006). Receptorska tirozin kinaza c-MET normalno je eksprimirana u epitelnim stanicama i melanocitima, a aktivira se vezanjem liganda, faktora rasta hepatocita (HGF). Iako je MET normalno aktiviran parakrino, kod melanoma je primijećena njegova autokrina aktivacija. Pojačana ekspresija c-MET u metastatskom melanomu rezultat je amplifikacije gena i ne dolazi do točkastih mutacija kao što je to slučaj u drugim tipovima tumora. Istraživanja su pokazala da pojačana razina ekspresije c-MET korelira s vjerojatnošću metastaziranja melanoma. Još jedna receptorska tirozin kinaza koja služi kao receptor za faktor matičnih stanica (SCF) je c-KIT. Upravo je kod melanoma često zabilježen gubitak funkcije tog gena (Chin i sur. 2006).

PI3K-AKT put često je pojačano aktivan u melanomu. Integrini i faktori rasta potiču rast melanomskih stanica i njihovo preživljavanje upravo preko aktivacije PI3K/AKT. Povišena razina fosforiliranog AKT-a negativno korelira s preživljenjem pacijenata. Za razliku od kinaznog puta MAP, specifične genetičke promjene ne događaju se često u ovom signalnom putu kod melanoma. Od onih kod kojih se ipak događaju najpoznatiji je tumor supresor *PTEN* koji kodira lipidnu i proteinsku fosfatazu. Ovaj protein regulira izvanstanične signale rasta koji koriste fosfatidilinozitol trifosfat (PIP3) kao unutarstanični sekundarni glasnik. U prisutnosti signala faktora rasta unutarstanična razina PIP3 raste što dovodi do fosforilacije AKT-a za koji je poznato da potiče napredovanje u staničnom ciklusu i inhibira apoptozu. PTEN regulira razinu PIP3 pa njegova inaktivacija rezultira akumulacijom PIP3, hiperfosforilacijom AKT-a te pojačanom proliferacijom. Kod 20-40% melanoma promijenjena je razina ekspresije PTEN-a, iako su rijetke točkaste mutacije i delecije oba alela. Pokazano je da konstitutivna aktivacija AKT-a ima onkogeni učinak u slučaju melanocita. Kopija DNA koja na sebi ima lokus za AKT3 prisutna je u 40-60% sporadičnih tumora. AKT3 najjače korelira s napretkom melanoma u odnosu na ostale 2 izoforme. Aktivacija AKT1 inhibira migraciju i invazivnost određenih staničnih linija melanoma (Chin i sur. 2006).



Slika 2. Aktivacija signalnog puta MAPK u melanomu. Preuzeto i prilagođeno prema Arkenau i sur. (2011).

1.2.2. Liječenje melanoma

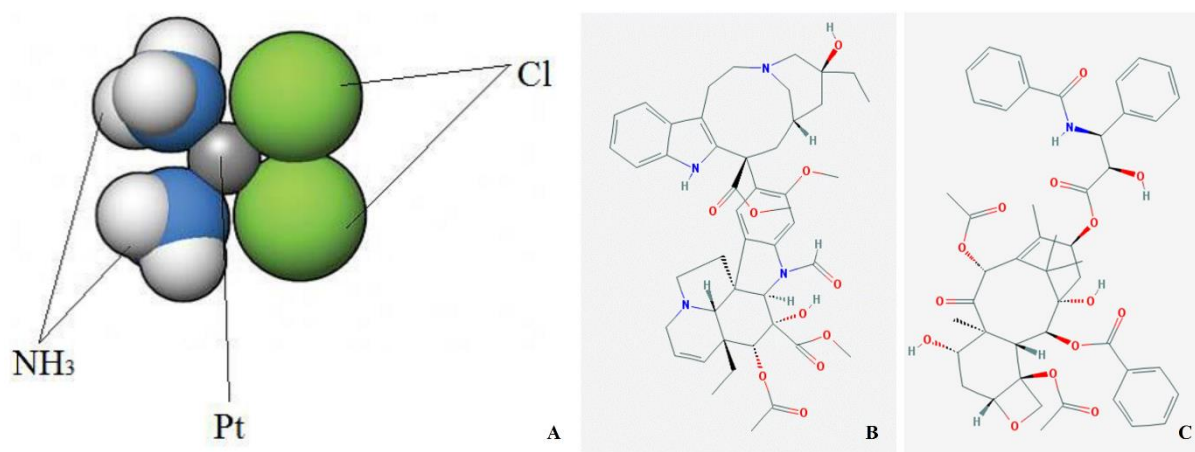
1.2.2.1. Klasična terapija

Vrsta liječenja koja će se primjenjivati ovisi o stadiju i lokalizaciji melanoma, ali i općem zdravlju pacijenta. U klasičnoj se terapiji primjenjuju kirurški zahvat, kemoterapija i radioterapija. U nekim se slučajevima ovi pristupi kombiniraju međusobno ili s nekim od ciljanih terapija. Za dijagnosticiranje melanoma potrebno je napraviti biopsiju kože. Ako biopsija potvrdi da se radi o melanomu, radi se kirurški zahvat kako bi se melanom u potpunosti odstranio. Ovim je tretmanom, ako nije došlo do metastaziranja, moguće u potpunosti izliječiti pacijenta. Ako postoji sumnja da je tumor metastazirao ili ako je veći od 1 mm, može se napraviti biopsija najbližeg limfnog čvora. U slučaju da su rezultati biopsije pozitivni uklanjaju se svi obližnji limfni čvorovi. Ako je melanom metastazirao na udaljene organe, primjenjuje se kemoterapija. Za liječenje uznapredovalih melanoma koriste se neki oblici imunoterapije i ciljane terapije za koje je pokazano da pokazuju veću učinkovitost od kemoterapije. Zračenje

se ne koristi često u terapiji melanoma, iako se nekad primjenjuje nakon kirurškog otklanjanja nekih vrsta melanoma ili metastaza u limfnim čvorovima. Moguće ga je i primjenjivati u palijativnoj terapiji (<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-treating-general-info>).

Iako kemoterapija nije učinkovita kod melanoma kao što je kod nekih drugih vrsta tumora, korisna je pri olakšavanju simptoma i produljenju života pacijenata. Najčešće lijekovi u liječenju melanoma su dakarbazin, temozolomid, paklitaksel, vinkristin i cisplatina, a mogu se davati samostalno ili u kombinaciji s drugim oblicima terapija (<http://www.cancer.net/cancer-types/melanoma/treatment-options>).

U daljnjim poglavljima detaljnije su opisana 3 protutumorska lijeka važna za ovo istraživanje (slika 3).



Slika 3. Strukturne formule korištenih protutumorskih lijekova. Cisplatina (A) (preuzeto iz Goodsell (2006)). **Vinkristin (B)** (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5978>). **Paklitaksel (C)** (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36314>).

1.2.2.1.1. Paklitaksel

Paklitaksel (taksol) je spoj koji se koristi za liječenje tumora jajnika, dojke, pluća, gušterače i drugih. Spada u grupu spojeva taksana, a izoliran je iz kore pacifičke tise (lat. *Taxus brevifolia*). Mehanizam njegovog djelovanja je sprječavanje depolimerizacije mikrotubula vezanjem na β podjedinicu tubulina. Na taj način ovaj spoj remeti funkciju diobenog vretena tijekom diobe stanica te izaziva apoptozu (Zhou i Giannakakou 2005).

1.2.2.1.2. Vinkristin

Vinkristin je izoliran iz biljke *Catharanthus roseus*, prije znane kao *Vinca rosea*. Pripada skupini vinka alkaloida, a najčešće se primjenjuje kod oboljelih od Hodgkinovog i ne-Hodgkinovog limfoma, akutne limfoblastične leukemije (ALL) i nefroblastoma. Uglavnom se ne daje samostalno, nego u kombinaciji s drugim lijekovima. Djeluje tako što se veže na dimere tubulina i tako inhibira njihovu polimerizaciju. Posljedica toga je zastoj staničnog ciklusa u metafazi (Zhou i Giannakakou 2005).

1.2.2.1.3. Cisplatina

Cisplatina ili cis-diaminodiklorplatina (CDDP) jedan je od najkorištenijih i najuspješnijih protutumorskih lijekova (Cepeda i sur. 2007). Primjenjuje se u liječenju tumora glave i vrata, testisa, mokraćnog mjehura, vrata maternice, pluća, melanoma i drugih. Strukturu ovog spoja čini atom platine okružen s dva atoma klora i dvije amonijeve skupine (slika 3). Upravo je zbog iona klora cisplatina tako učinkovita. Dok se nalazi izvan stanice, gdje je koncentracija kloridnih iona visoka, cisplatina je stabilna. Ulaskom u stanicu u kojoj je koncentracija kloridnih iona puno niža, cisplatina otpušta ione klora i zamjenjuje ih s molekulama vode (Goodsell 2006). Taj spoj je vrlo reaktivan pa reagira s mnogim molekulama u stanici. Iako se na DNA veže 5-10% cisplatine, smatra se da je genomska DNA njena primarna meta. S DNA reagira tako što se veže na atom N7 adenina i gvanina u velikom utoru dvostruke zavojnice pa tako nastaju intra- i intermolekulske križne veze koje uzrokuju zaustavljanje replikacije i transkripcije DNA, a u konačnici i smrt stanice (Cepeda i sur. 2007). Osim toga, pokazano je da cisplatina djeluje na stanice tumora i stvaranjem reaktivnih kisikovih vrsta (Brozović i sur. 2010).

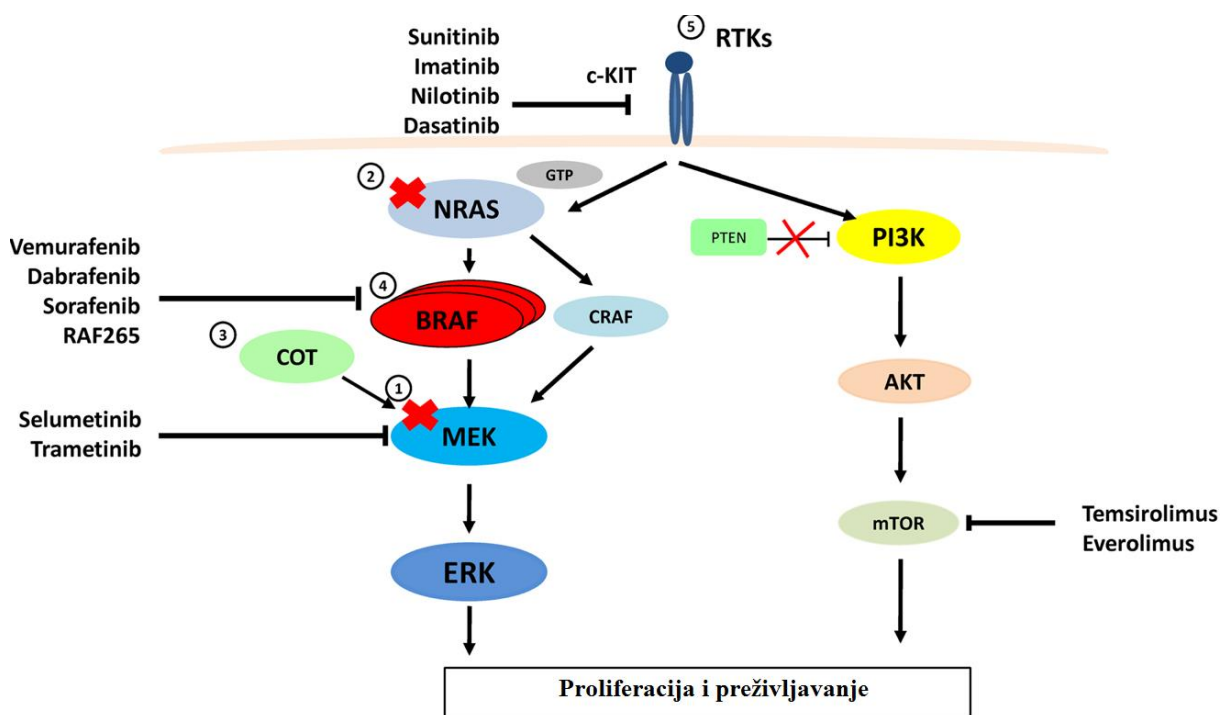
1.2.2.2. Novi oblici terapija

U poglavlju 1.2.2.1. ukratko je opisano koji se sve oblici terapije melanoma primjenjuju, a u ovom poglavlju detaljnije će od novih oblika terapija biti opisana ciljna terapija s naglaskom na inhibitore dasatinib i PP2. Ovi su spojevi neke od potencijalnih terapija za melanom, a u

ovom radu je ispitivano njihovo djelovanje u kombinaciji s protutumorskim lijekovima paklitakselom, vinkristinom i cisplatinom.

1.2.2.2.1. Ciljana terapija

Otkrivanje ključnih mutacija i signalnih puteva važnih u nastanku melanoma otvorilo je vrata ciljanoj terapiji. Detaljnije analize molekularnog mehanizma nastanka melanoma otkrivaju nove potencijalne mete te time omogućuju razvoj novih terapijskih pristupa (slika 4). Danas se uglavnom razvoj ciljanih terapija temelji na inhibiranju mutiranih kinaza BRAF, MEK i c-KIT koje su uključene u signalni put MAPK (tablica 1).



Slika 4. Ciljane terapije i njihove mete u liječenju melanoma. Vemurafenib i Dabrafenib za BRAFV600E, dok su Sorafenib i RAF265 opći inhibitori RAF-a. Imatinib, Nilotinib, Dasatinib i Sunitinib inhibiraju c-KIT. Selumetinib i Trametinib inhibiraju MEK. Temsirolimus i Everolimus inhibiraju molekulu mTOR. Preuzeto i prilagođeno prema Klinac i sur. 2013.

Više od polovice melanoma ima neku od mutacija u genu *BRAF*. Te mutacije uzrokuju promjenu u istoimenom proteinu koji taj gen kodira, a njihova posljedica je ubrzan i nekontroliran rast stanica. Dva selektivna inhibitora BRAFV600E, Vemurafenib i Dabrafenib,

pokazala su značajan protutumorski efekt. Vemurafenib inhibira V600E, ali s puno manjom djelotvornošću i neke druge kinaze kao što su CRAF, ARAF i nemutiran BRAF. Ovi lijekovi imaju sposobnost usporavanja rasta tumora ili ga mogu čak i smanjiti što za posljedicu ima produžavanje života pacijenta. Međutim, važno je utvrditi da je u melanomu stvarno prisutna ova mutacija jer u suprotnom terapija neće djelovati. Neki od pacijenata koji primaju ovu terapiju mogu razviti drugi tip tumora kože, karcinom pločastih stanica, koji je obično manje opasan od melanoma te ga je lako odstraniti. Dabrafenib je reverzibilan inhibitor BRAF600E, a blokira je CRAF i nemutiran BRAF 5 puta neučinkovitije. Mnogobrojnim kliničkim ispitivanjima zaključeno je da tretman Vemurafenibom ili Dabrafenibom pospješuje preživljenje pacijenata koji boluju od metastatskih melanoma, a njihov nedostatak je to što na njih reagira samo dio pacijenata (Trinh i sur. 2014; Tsao i sur. 2012).

Multi-kinazni inhibitor RAF-a, Sorafenib, je lijek koji ima nekoliko meta u stanici. Neke od njih su VEGFR-2, DPGFR, c-KIT, FLT-3, CRAF i BRAF. Studije *in vitro* pokazale su da Sorafenib inducira zaustavljanje staničnog ciklusa i apoptozu u stanicama melanoma ometanjem signalnog puta MAPK. Studije pokazuju da kao monoterapija ima ograničenu aktivnost u pacijenata s metastatskim melanomima bez obzira na prisutnost mutacije BRAFV600E u tumoru. Istražuje se i njegova djelotvornost u kombinaciji s drugim terapeutima. Kinazni inhibitori širokog spektra djelovanja, RAF-265 i XL281, poznati po tome što ciljaju ARAF, BRAF, CRAF i VEGFR, imaju jači učinak i nešto veću selekciju za ciljanje BRAF u odnosu na Sorafenib, no zbog razvoja novih inhibitora BRAF-a, RAF-265 kao monoterapija melanoma više nije u fokusu istraživanja. Kombinira ga se s inhibitorom MEK-a (MEK162) kod pacijenata s mutacijom BRAFV600E i/ili mutacijom RAS-a u kliničkim studijama (Mangana i sur. 2012).

Razvijanje inhibitora za NRAS pokazalo se vrlo zahtjevnim jer njegova GTP-azna aktivnost ne omogućuje dizajn prikladnih malih molekula kao inhibitora. Utišavanje NRAS pomoću malih inhibitorskih RNA (siRNA) u 2 melanomske stanične linije inhibira proliferaciju i čini stanice osjetljivijim na protutumorske lijekove. Zbog nepostojanja uspješnih inhibitora NRAS, boljom se opcijom čini razvoj inhibitora koji ciljaju molekule nizvodno od RAS-a. Jedna od takvih molekula je kinaza MEK (Klinac i sur. 2013).

MEK sudjeluje u istom signalnom putu kao i BRAF, ali nizvodno od njega tako da se lijekovi koji inhibiraju MEK mogu koristiti i u liječenju melanoma s mutacijama u BRAF-u. Selumetinib je selektivni inhibitor kinaze aktivirane mitogenom ERK-a (MEK1/2). Uspješna

klinička istraživanja s ovim lijekom otvorila su vrata MEK inhibitorima u terapiji melanoma. Kombinira ga se u istraživanjima s MK2206, inhibitorom AKT-a, u terapiji melanoma. MEK162 je također selektivni inhibitor MEK1/2 koji inhibira i MEK i fosforilaciju ERK-a. Trametinib je selektivan inhibitor MEK1/2 koji pokazuje prilično dobre rezultate kod pacijenata. Studije pokazuju da kombiniranje inhibitora BRAF-a i MEK-a u terapiji melanoma može dovesti do dugotrajnijeg usporavanja tumora, ali i smanjivanja nuspojava (Klinac i sur. 2013; Tsao i sur. 2012).

Manji dio melanoma ima promjene u genu za c-KIT. Ove su promjene najčešće kod melanoma koji nastaju na dlanovima, ispod noktiju, na sluznicama te područjima koja su kronično izložena suncu. Aktivirajuće mutacije u genu *c-KIT* dovode do poticanja signalnih puteva MAPK i PI3K-AKT uzrokujući proliferaciju i bolje preživljenje stanica. Sunitinib, inhibitor c-KIT proteina potencijalni je inhibitor i mutiranog KIT-a. Istraživanja pokazuju da bi se Sunitinib mogao koristiti u terapiji melanoma. Također se proučava kombinacija Sunitiniba i protutumorskog lijeka temozolomida za liječenje metastatskog melanoma. Imatinib je inhibitor receptorskih tirozinskih kinaza ABL, c-KIT i PDGFR, a odnedavno ga se počelo proučavati kao lijek u terapiji melanoma. Primijećeno je njegovo bolje djelovanje ako su mutacije u KIT-u prisutne u eksonima 11 i 13. Nilotinib je inhibitor tirozinskih kinaza druge generacije, a inhibira KIT, PDGFR i BCR-Abl. Prvo je odobren u svrhu liječenja kronične mijeloične leukemije (CML), a djeluje slično kao i Imatinib. Razmatra ga se kao terapiju melanoma s mutacijom ili amplifikacijom KIT-a (Zhu i sur. 2016).

Terapeutska važnost signalnog puta PI3K/AKT u melanomu nije toliko dobro proučena kao što je to slučaj kod puta MAPK. Ipak, jasno je da njihovo ispreplitanje potiče razvoj melanoma te je odgovorno za rezistenciju na inhibitore BRAF-a. Zbog nedostatka inhibitora za AKT i PI3K pažnja je preusmjerena na molekulu mTOR i njegove inhibitore kao što su Temsirolimus i Everolimus. Studije pokazuju da istovremeno ciljanje signalnih puteva PI3K i MAPK daje dobre rezultate, a njihovi inhibitori pokazuju sinergistički učinak kad se koriste u kombinaciji sa Sorafenibom i inhibitorima MEK-a. Everolimus se istražuje kao potencijalna terapija metastatskog melanoma u kombinaciji s karboplatinom, paklitakselom i Bevacizumabom ili temozolomidom (Klinac i sur. 2013).

Iz svega navedenog jasno je da će se buduća klinička istraživanja fokusirati na kombiniranje ciljanih terapija u pacijenata s melanomom s nadom da će se poboljšati preživljenje pacijenata i smanjiti ponovna pojava tumora.

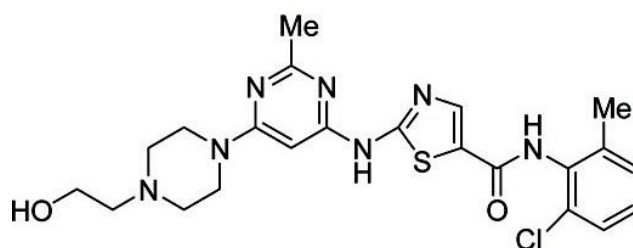
Tablica 1. Protutumorski inhibitori razmatrani za terapiju melanoma. Preuzeto i prilagođeno prema Klinac i sur. 2013.

SIGNALNI PUT	NAZIV TERAPIJE	CILJNI PROTEIN	SPECIFIČNA MUTACIJA
MAPK	Vemurafenib	BRAF	V600E/K
	Dabrafenib	BRAF	V600E/K
	Sorafenib	ARAF, BRAF, CRAF, VEGF2/3, KIT, PDGFR	-
	RAF-265	ARAF, BRAF, CRAF, VEGFR	-
	Selumetinib	MEK	-
	Trametinib	MEK	BRAFV600E/K
PI3K/AKT	Sunitinib	c-KIT	-
	Imatinib	c-KIT	-
	Nilotinib	c-KIT	-
	Dasatinib	c-KIT	eksoni 11 i 13
	Temsirolimus	mTOR	-
	Everolimus	mTOR	-
Blokiranje imunosupresije	Ipilimumab	CTLA-4	-
	MDX-1106	PD-1	-
	MK-3475	PD-1	-
	BSM-936559	PD-1	-

1.2.2.2.1.1. Dasatinib

Dasatinib (Sprycel), ranije poznat kao BMS-354825, protutumorski je lijek koji se prvenstveno daje pacijentima oboljelim od kronične mijeloične leukemije (CML) i akutne limfoblastične leukemije (ALL). Inhibitor je raznih tirozinskih kinaza, uključujući ABL, c-KIT, PDGFR, obitelj Src kinaza (SFK) te efrinske receptore. Danas se njegovo djelovanje ispituje na mnogim vrstama tumora, a među njima i na melanomu (Kim i sur. 2010).

Kemijsko je ime dasatiniba N-(2-kloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil]-2-metil-4-pirimidinil]amino]-5-tiazolekarboksiamid monohidrat (slika 5). Njegova molekularna formula je $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$, što odgovara molekularnoj masi od 488,01 g/mol. Dasatinib se metabolizira u tijelu čovjeka, ponajprije enzimom CYP3A4 koji je odgovoran za stvaranje njegovog aktivnog metabolita. Budući da je dasatinib supstrat enzima CYP3A4, njegov se utjecaj može promijeniti inhibitorima tog metaboličkog enzima. Topivost mu ovisi o pH pa lijekovi koji mijenjaju pH mogu utjecati i na efikasnost terapije (Kim i sur. 2010; Korashy i sur. 2014).



Slika 5. Strukturna formula dasatiniba (<http://cenblog.org/the-haystack/files/2012/01/dasatinib.jpg>)

Mehanizam djelovanja dasatiniba je inhibicija fosforilacije tirozina obitelji Src kinaza, BCR-Abl, PDGFR i c-KIT, čime one gube svoju funkciju. Jedna je od važnijih osobina dasatiniba širok spektar djelovanja. Iako je definiran kao inhibitor nekoliko tirozinskih kinaza, mnoge studije i dalje pronalaze nove mete dasatiniba. Proteomskim je analizama predloženo 79 različitih meta dasatiniba, od kojih se za 52 može reći da ih snažno inhibira. Zbog toga i zbog različite razine ekspresije tirozinskih kinaza u raznim tkivima prognoziranje je inhibicije dasatinibom nezahvalno. U predkliničkim je modelima pSrc(Y418) predložen kao biomarker

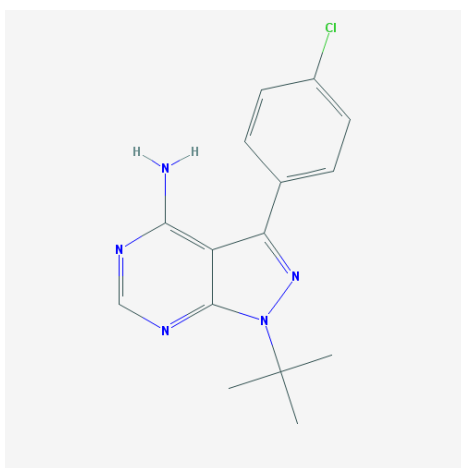
aktivnosti Src kinaze, no nedavna ispitivanja ukazuju na to da bi možda molekule nizvodno od direktnih meta bili informativniji biomarkeri (Kim i sur. 2010).

Pleuralna efuzija česta je nuspojava liječenja dasatinibom. Također je česta i neutropenija. Ove nuspojave uvelike ovise u dozi dasatiniba koja se primjenjuje. Dasatinib blokira migraciju, invazivnost i proliferaciju tumorskih stanica, a potiče u njima apoptozu. Posljedica toga je smanjivanje tumorske mase i učestalosti metastaziranja tumorskih stanica. Predkliničke studije pokazuju potencijal dasatiniba u liječenju raznih solidnih tumora u kombinaciji s različitim vrstama terapija (Kim i sur. 2010).

1.2.2.2.1.2. PP2

PP2 je također protutumorski spoj koji se koristi kao selektivni inhibitor kinaza obitelji Src kao što su Lck, Fyn, Hck i Src. Osim toga, ovaj je spoj pokazao i nešto slabiju sposobnost inhibicije receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) te kinaza ZAP-70 i JAK2 (Hanke i sur. 1996.) Međutim, novija su istraživanja pokazala da PP2 nije toliko selektivan kako se prije mislilo jer podjednako učinkovito inhibira i mnoge druge kinaze (Bain i sur. 2007).

Kemijsko ime PP2 je 4-amino-5-(4-klorofenil)-7-(dimetiletil)pirazolo[3,4-d]pirimidin (slika 6). Njegova je molekularna formula C₁₅H₁₆ClN₅, što odgovara molekularnoj masi od 301,77 g/mol (<http://www.abcam.com/pp2-ab120308.html>).



Slika 6. Strukturna formula PP2 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=4878>)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći je cilj ovoga rada istražiti mogućnost liječenja melanoma kombinacijom inhibitora protein tirozin kinaza dasatiniba sa svakim od tri protutumorska lijeka, cisplatinom, paklitakselom i vinkristinom. Uspješno kombiniranje dasatiniba s protutumorskim lijekovima omogućilo bi liječenje tumora znatno nižim dozama pojedinačnih lijekova uz jednak učinak, što bi rezultiralo smanjenjem nuspojava kod pacijenata.

Specifični ciljevi ovog rada su na modelima stanica melanoma čovjeka RPMI-7951, SK-MEL-3, MeWo i A375 istražiti: (i) osjetljivost na paklitaksel, cisplatinu i vinkristin; (ii) osjetljivost na dasatinib; (iii) osjetljivost na kombiniranu primjenu dasatiniba i svakog od tri protutumorska lijeka paklitaksela, vinkristina i cisplatine u staničnim linijama koje se pokazuju osjetljivim na ispitivane spojeve; (iv) je li Src meta dasatiniba u, na njega najosjetljivijoj, staničnoj liniji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Osnovne kemikalije

Osnovne kemikalije korištene u ovom radu navedene su u tablici 2.

Tablica 2. Osnovne kemikalije.

KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ	KEMIKALIJA	PROIZVOĐAČ
cisplatina (cDDP) ($[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$)	Sigma-Aldrich, Njemačka	2-merkaptetanol ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$)	Serva, Njemačka
vinkristin ($\text{C}_{46}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_{10}$)	Sigma, SAD	Ponceau S ($\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$)	Sigma, Njemačka
paklitaksel ($\text{C}_{47}\text{H}_{51}\text{NO}_{14}$)	Sigma, SAD	natrij-dodecil sulfat (SDS) ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$)	Serva, Njemačka
dasatinib ($\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_7\text{O}_2\text{S}$)	Sigma-Aldrich, Njemačka	N,N,N,N - tetrametiletilendiamin (TEMED) ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)	Serva, Njemačka
Dulbeccova modifikacija Eaglove hranjive podloge (engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , DMEM)	Invitrogen, SAD	Tween-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	Sigma, SAD
serum fetusa goveda (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Invitrogen, SAD	nemasno mlijeko u prahu	Roth, Njemačka
tripsin	Invitrogen, SAD	<i>Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus</i>	PerkinElmer Life Science, SAD
3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-difeniltetrazolijev bromid) (MTT) ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$)	Chemicon International, SAD	Razvijač	Fotokemika, Hrvatska
dimetilsulfoksid (DMSO) ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	Kemika, Hrvatska	Fiksir	Fotokemika, Hrvatska
amonijev persulfat (APS) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Serva, Njemačka	Tris-klorovodična kiselina (Tris-HCl)	Serva, Njemačka
akrilamid ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)	Serva, Njemačka	Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Merck, SAD

bisakrilamid (C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂)	Serva, Njemačka	metanol (CH ₃ OH)	Kemika, Hrvatska
glicin (NH ₂ CH ₂ COOH)	Sigma, SAD	PP2 (C ₁₅ H ₁₆ ClN ₅)	Sigma-Aldrich, Njemačka
Kristacilin (C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Pliva, Hrvatska	streptomycin (C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂)	Sigma, SAD
bromfenol plavo (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	Serva, Njemačka	fenol crveno (C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S)	Sigma, SAD
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, SAD	Silencer Select Pre-designed & Validated siRNA	Ambion, SAD
Silencer Select Negative Control siRNA	Invitrogen, SAD	OptiMEM (engl. <i>minimum essential media</i>)	Invitrogen, SAD
deionizirana voda (diH ₂ O)	-		

3.1.2. Stanične linije

U ovom radu korištene su stanične linije melanoma RPMI-7951 (ATCC HTB-66), SK-MEL-3 (ATCC HTB-69), MeWo (ATCC HTB-65), A375 (ATCC CRL-1619) i karcinoma pločastog epitela jezika CAL 27 (ATCC CRL-2095). Sve navedene stanične linije rastu pričvršćene za podlogu.

3.1.3. Protutijela

Korištena protutijela za Western blot navedena su u tablici 3.

Tablica 3. Korištena protutijela.

	SPECIFIČNOST	PROIZVEDENO U ORGANIZMU	PROIZVOĐAČ	KATALOŠKI BROJ
PRIMARNA PROTUTIJELO	Src	kunić	Abcam, UK	ab32102
	pSrc(Y418)	kunić	Abcam, UK	ab4816
	ERK	kunić	Santa Cruz, SAD	SC-94
SEKUNDARNO PROTUTIJELO	zečji imunoglobulini	govedo	Santa Cruz, SAD	SC-2307

3.1.4. Priprema pufera i otopina

Sastav korištenih pufera i otopina te njihova priprema opisani su u tablici 4.

Tablica 4. Otopine i njihova priprema.

OTOPINA	PRIPREMA
cisplatina (500 ng/mL)	otapa se u vodi, čuva se pri -20°C
paklitaksel (6 mg/mL)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri -20°C
vinkristin (100 µg/mL)	otapa se u fosfatnom puferu (PBS), čuva se pri -20°C
dasatinib (10 mM)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri -20°C
PP2 (15 mg/mL)	otapa se u dimetilsulfoksidu (DMSO), čuva se pri -20°C
DMEM-FCS	DMEM sa 10%-tnim fetalnim goveđim serumom (FCS)
DMEM-FCS15	DMEM sa 15%-tnim fetalnim goveđim serumom (FCS)
matična otopina MTT (12,1 mM)	5 mg MTT-a otapa se u 1 mL fosfatnog pufera (PBS), filtrira se kroz filter papir i čuva se u tamnoj boci pri 4°C
tripsin	2,5 g tripsina + 0,01 g streptomocina + 0,006 g Kristacilina + 0,02 g fenol crvenila se otopi u otopini T, nadopuni se do 1 L i podesi pH na 7 do 7,2 te se sterilizira filtriranjem kroz filter veličine pora 0,22 µm
fosfatni pufer (s Mg^{2+} i Ca^{2+}), PBS	136,8 mM NaCl + 2,6 mM KCl + 9,6 mM NaH_2PO_4 + 0,24 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$ + 0,16 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$
fosfatni pufer (bez Mg^{2+} i Ca^{2+}), PBSΔ	137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 4,3 mM $NaH_2PO_4 \times 6H_2O$ + 1,4 mM K_2HPO_4
10x TBS	500 mL Tris-HCl(pH 7,5) + 300 mL 5 M NaCl + 200 mL diH_2O , čuva se pri 4°C
pufer TBST	50 mL pufera 10x TBS + 450 mL diH_2O + 500 µL Tween-20 (1x TBS sa 0,1% Tween-20), čuva se pri 4°C
Towbin pufer za prijenos (pH 8,1 do 8,4)	3,03 g Tris-a i 14,4 g glicina se otopi u diH_2O , dodaje 200 mL CH_3OH i

	nadopuni do 1 L s diH ₂ O (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 20% CH ₃ OH). Pufer se čuva pri 4°C
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	6 g Tris-a otapa se u 80 mL diH ₂ O. pH se podesi dodatkom 6 M HCl-a. Nadopuni se diH ₂ O do 100 mL. Čuva se pri 4°C
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	18,2 g Tris-a otapa se u 100 mL diH ₂ O. pH se potom podesi dodatkom 6 M HCl-a, čuva se pri 4°C
akrilamid/bisakrilamid (30%)	29,2 g akrilamida i 0,8 g bisakrilamida otapa se u 100 mL diH ₂ O, čuva se pri 4°C
10% amonijev persulfat (APS)	500 mg APS-a otapa se u 5 mL diH ₂ O. Čuva se pri –20°C u alikvotima po 500 µL
10% natrij-dodecilsulfat (SDS)	u 100 mL diH ₂ O otapa se 10 g SDS-a, čuva se pri sobnoj temperaturi
6X SB pufer (engl. <i>sample buffer za SDS-PAGE</i>)	1,2 g SDS-a otapa se u 2 mL diH ₂ O, dodaje 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) i 30 mg Bromfenol plavila, nakon što se otopi dodaje se 3 mL C ₃ H ₈ O ₃ i 1,2 mL C ₂ H ₆ SO. Dopuni se do 10 mL diH ₂ O i čuva pri –20°C u alikvotima po 500 µL
Tris-glicinski pufer za elektroforezu	3,2 g Tris-baze, 14,42 g glicina, 1 g SDS-a, nadopuni se do 100 mL sa diH ₂ O (25 M Tris, 192 mM glicin; 0,1% SDS; pH 8,3), čuva se pri 4°C
100 mM glicin za uklanjanje vezanih protutijela s membrane	7,51 g glicina otapa se u 1000 mL diH ₂ O (pH 2,8), čuva se pri 4°C

3.1.5. Uređaji i ostali materijali

U tablicama 5 i 6 navedeni su uređaji te ostali materijali i pomagala korišteni u svrhu izrade ovog rada.

Tablica 5. Korišteni uređaji.

UREĐAJ	PROIZVOĐAČ
automatski brojač stanica Coulter Counter	Beckman Coulter, UK
tresilica	Tehnica, Slovenija

inkubator za uzgoj stanica	Heraeus, Njemačka
kabinet za rad u sterilnim uvjetima	Klimaoprema, Hrvatska
magnetska miješalica	Tehnica, Slovenija
Mighty Small Transfer	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
spektrofotometar za mikrotitarske pločice StatFax 2100	Awareness Technology INC, SAD
svjetlosni mikroskop	Zeiss, Njemačka
termoblok Thermomixer compact	Eppendorf, Njemačka
Treslica	Tehnica, Slovenija
sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, SAD
vibracijska miješalica Vibromix 301EVT	Tehnica, Slovenija
vodena kupelj	Tehnica, Slovenija
uređaj za razbijanje stanica ultrazvukom (sonikator)	Cole Palmer, SAD

Tablica 6. Korišteni materijali i pomagala.

MATERIJAL	PROIZVODAČ
bočice za uzgoj stanica, T-25 i T-75	Falcon Becton Dickinson, SAD
pločice za uzgoj stanica s 6 i 96 bunarića	Falcon Becton Dickinson, SAD
gumena strugalica (engl. <i>policeman</i>)	Falcon Becton Dickinson, SAD
plastične pipete	Falcon Becton Dickinson, SAD
staklene pipete	Superior, Njemačka
mikropipete	Eppendorf, Njemačka; Rainin
nastavci za mikropipete	Eppendorf, Njemačka; Rainin
propipeta	Brand, Njemačka
Pipetboy	Integra Biosciences, SAD
nitrocelulozna membrana s porama 0,45 µm	Sigma-Aldrich, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanica u kulturi

Sve korištene stanične linije rastu pričvršćene za podlogu. Stanice su uzgajane *in vitro* u bočicama za uzgoj stanica T-25 (površina 25 cm²) i T-75 (površina 75 cm²) u inkubatoru za uzgoj stanica pri 37°C uz 5% CO₂. Stanične linije RPMI-7951, MeWo i A375 uzgajane su u podlozi s 10% fetalnog goveđeg seruma (FCS), dok je stanična linija SK-MEL-3 uzgajana u podlozi s 15% fetalnog goveđeg seruma (FCS).

3.2.2. Presađivanje stanica

Stanice rastu prihvaćene za podlogu dok ne iscrpe hranjivu podlogu ili ju u potpunosti prekriju, te ih je tada potrebno presađiti. Tripsin i hranjivu podlogu koji se koriste za presađivanje stanica potrebno je prethodno zagrijati u vodenoj kupelji na 37°C. Prvo se ukloni hranjiva podloga sa stanica te se one isperu s 1-2 mL tripsina. Nakon toga se dodaje novih 1-2 mL tripsina, a odvajanje stanica od podloge prati se svjetlosnim mikroskopom. Kada se stanice odvoje potrebno je zaustaviti djelovanje tripsina dodavanjem svježe hranjive podloge tako da se tripsin razrijedi najmanje 5 puta. Stanice je zatim potrebno dobro, ali nježno, resuspendirati višestrukim uvlačenjem i ispuštanjem iz pipete. Dobivena suspenzija stanica služi za novo nasađivanje ili izvođenje eksperimenata.

3.2.3. Utišavanje gena

Utišavanje gena RNA interferencijom (RNAi) postignuto je transfekcijom malim interferirajućim RNA (siRNA). U ovom je radu korištena siRNA specifična za tirozin kinazu Src. Za kontrolu je korištena komercijalno dostupna kontrolna siRNA. Stanice su transficirane odgovarajućim siRNA uz pomoć liposoma, komercijalno dostupnim kompletom reagencija Lipofectamine RNAiMAX prema uputama proizvođača. Dan prije postupka utišavanja stanice su nasađene u pločice za uzgoj kulture stanica sa 6 bunarića tako da u svakom bunariću bude 3x10⁵ stanica u volumenu od 1,5 mL. Ova količina stanica je odabrana kako bi sutradan, za

uspješnu transfekciju siRNA, stanice popunile 30-50% podloge na kojoj rastu. Točan broj stanica određen je uz pomoć automatskog brojača stanica.

Za transfekciju svakog pojedinog bunarića pripremljene su po 2 otopine: otopina A i otopina B, svaka u konačnom volumenu od 250 μ L. Otopina A sadrži siRNA u OptiMEM-u tako da je koncentracija u konačnom volumenu nakon dodavanja na stanice 80 nM (koncentracija odabrana empirijski, Stojanović i sur. 2016). Otopina B je Lipofectamine RNAiMax Reagent razrijeđen u OptiMEM-u. U ovom je radu korišteno 3 μ L liposoma po bunariću.

U pokusima utišavanja gena transfekcijom specifičnim siRNA korištene su dvije kontrole. Jedna kontrola podrazumijeva transfekciju nespecifičnom siRNA u istoj koncentraciji kao i siRNA za utišavanje proteina Src, dok se u drugoj kontroli uzgajaju netransficirane stanice s kojima se postupalo na jednak način kao i sa stanicama za utišavanje. Stanice su nakon transfekcije ostavljene rasti 24 sata u inkubatoru za uzgoj kulture stanica u već opisanim standardnim uvjetima, nakon čega su stanice podvrgnute metodama MTT test i Western blot.

3.2.4. Određivanje preživljenja stanica testom MTT

Test MTT je kolorimetrijska metoda koja služi za određivanje preživljenja stanica. Temelji se na sposobnosti staničnog enzima sukcinat dehidrogenaze da reducira tetrazolijevu sol MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) u ljubičaste kristale formazana. Ti kristali nisu topljivi u DMEM-FCS u kojem nastaju, već u dimetil-sulfoksidu (DMSO) koji se naknadno dodaje. Apsorbancija se mjeri pomoću čitača mikrotitarskih pločica, a preživljenje stanica proporcionalno je izmjerenoj apsorbanciji.

Za izvedbu ovog testa stanice se nasađuju u pločicu za uzgoj stanica s 96 bunarića, tako da u svakom bunariću bude 1×10^4 (RPMI-7951 i MeWo), odnosno 3×10^5 (A375 i SK-MEL-3), stanica u 180 μ L hranjive podloge; količina stanica ovisi o brzini proliferacije stanica. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja stanicama se dodaje 20 μ L otopine spoja čija se citotoksičnost ispituje tako da konačan volumen u bunarićima bude 200 μ L te se pločica sa stanicama ostavlja u inkubatoru tijekom 72 sata. Za svaku koncentraciju spoja koji se ispituje priprema se tri (triplikat) ili četiri (kvadriplekat) istovjetna uzorka. Konačne koncentracije ispitivanih spojeva prikazane su u tablici 7. Za mjerenje udjela preživjelih stanica naglim se okretanjem pločice ukloni hranjiva podloga. U svaki bunarić dodaje se 40 μ L otopine MTT koja se priprema razrjeđivanjem jednog volumena matične otopine MTT s devet volumena hranjive podloge

DMEM-FCS. Zatim slijedi inkubacija od 3 sata tijekom koje se razviju kristali formazana. Kristali se otapaju dodatkom 170 μL DMSO-a po bunariću. Pločica se zatim stavlja na tresilicu kako bi se kristali u potpunosti otopili te se na kraju mjeri apsorbancija pri 600 nm i računa preživljenje prema sljedećoj formuli:

$$\text{preživljenje (\%)} = \frac{\text{apsorbancija stanica izloženih djelovanju citostatika} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}{\text{apsorbancija kontrolnih stanica} - \text{apsorbancija negativne kontrole}}$$

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni i prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Tablica 7. Korištene koncentracije ispitivanih spojeva.

SPOJ	MATIČNA OTOPINA	KONAČNE KONCENTRACIJE
cisplatina (cDDP)	500 $\mu\text{g/mL}$	0,125; 0,156; 0,25; 0,312; 0,39; 0,5; 0,625; 0,78; 1; 1,25; 1,56; 2,5; 3,25; 6,25; 12,5; 25 $\mu\text{g/mL}$
paklitaksel (TAX)	6×10^3 $\mu\text{g/mL}$	0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 $\mu\text{g/mL}$
vinkristin (VCR)	100 $\mu\text{g/mL}$	0,000625; 0,00125; 0,0025; 0,005; 0,00625; 0,01; 0,0125; 0,02; 0,025; 0,04; 0,05; 0,08; 0,1; 0,16; 0,32 $\mu\text{g/mL}$
dasatinib (DAS)	$4,88 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$	0,00152; 0,00228; 0,00305; 0,00457; 0,00488; 0,0061; 0,0089; 0,0122; 0,0183; 0,0244; 0,0366; 0,0488; 0,0732; 0,0976; 0,1464; 0,1952; 0,2928; 0,3904; 0,488 $\mu\text{g/mL}$
PP2	$1,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/mL}$	0,012; 0,0241; 0,0482; 0,0965; 0,1886; 0,3772; 0,7544; 1,5088 $\mu\text{g/mL}$

3.2.5. Razdvajanje proteina metodom SDS-PAGE

Denaturirajuća diskontinuirana elektroforeza u poliakrilamidnom gelu pomoću natrij dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je metoda kojom je moguće razdvojiti proteine isključivo na temelju razlike u njihovoj molekulskoj masi. SDS je anionski detergent koji uzrokuje razmatanje proteina, pridodaje im jednaki površinski negativan naboj te tako omogućuje razdvajanje proteina po molekulskoj masi.

Uzorci za SDS-PAGE se pripremaju tako da se sa stanica ukloni hranjiva podloga, isperu se 2 puta sa PBS-om te se zatim na njih doda pufer za nanošenje uzoraka 1 x SB zagrijan na 96°C. Stanice se sastružu gumenom strugalicom i prebace u mikroepruvete. Dobivena smjesa vrlo je viskozna zbog prisutne DNA pa ju je potrebno izložiti ultrazvuku amplitude 30% tijekom 15 sekundi kako bi se pocijepala. Tako se obrađeni uzorci mogu odmah nanositi na gel ili pohraniti pri -20°C.

Gel za SDS-PAGE priprema se prema podacima u tablici 8. Prvo se izlijeva donji gel ili gel za razdvajanje, a nakon njega gornji gel, odnosno gel za sabijanje. Nakon što se gelovi izliju i polimeriziraju slaže se aparatura za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN Tetra Cell. Pripremljeni gelovi se prekrivaju Tris-glicinskim puferom za elektroforezu, nanose se na gel uzorci (60 µL) i standard za određivanje molekulske mase proteina, te se vrši elektroforeza uz konstantan napon od 90 V.

Tablica 8. Komponentne korištene za izradu gelova

REAGENS (KONCENTRACIJA)	5%-TNI GEL ZA SABIJANJE	10%-TNI GEL ZA RAZDVAJANJE
deH ₂ O	3,65 mL	6,8 mL
Tris-HCl pH 6,8 (0,5 M)	0,5 mL	-
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	-	3 mL
SDS (10%)	0,05 mL	0,15 mL
APS (10%)	0,0175 mL	0,05 mL
akrilamid/bisakrilamid (30%)	0,8 mL	5,05 mL
TEMED	0,005 mL	0,0075 mL
ukupni volumen	5,0225 mL	15,0575 mL

3.2.6. Analiza proteina metodom Western blot

Western blot je analitička metoda koja služi za otkrivanje prisutnosti i količine specifičnih proteina u nekom proteinskom homogenatu ili ekstraktu razdvojenom pomoću natrij dodecil sulfat elektroforeze u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Proteini se nakon razdvajanja pomoću SDS-PAGE prenose s gela na nitroceluloznu membranu veličine pora 0,45 μm . Za prijenos se koristi Towbinov pufer, u uređaju Mini-PROTEAN Tetra Cell pri 400 mA, tijekom jednog sata. Ciljni se proteini otkrivaju specifičnim protutijelima.

Uspješnost prijenosa na membranu provjerava se bojanjem membrane u otopini Ponceau S. Nakon toga slijedi odbojavanje ispiranjem u vodi i blokiranje membrane u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u TBST puferu u trajanju od jednog sata. Pri blokiranju se proteini iz mlijeka vežu na mjesta na membrani gdje se ne nalaze proteini iz uzorka.

Membrana se ispire u puferu TBST te inkubira s primarnim protutijelom (razrjeđenje protutijela utvrđeno je iskustveno) u trajanju od 2 sata. Nakon ponovnog ispiranja u puferu TBST membrana se inkubira 2 sata sa sekundarnim protutijelom (razrjeđenje protutijela utvrđeno je iskustveno) koje je obilježeno peroksidazom hrena (tablica 9). Membrana se po završetku inkubacije ispire u puferu TBST i inkubira u otopini *Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus*. Kemiluminiscentni signal bilježi se izlaganjem membrane fotografskom filmu koji se odmah razvija u otopini razvijača, a nakon ispiranja u vodi i fiksira u otopini fiksativa. Nakon fiksacije film se ispire vodom i suši.

Tablica 9. Razrjeđenje primarnih i sekundarnih protutijela korištenih za Western blot.

PROTUTIJELO	RAZRJEĐENJE	VOLUMEN (μL)*	MOLEKULARNA MASA (kDa)
pSrc(Y418)	1:1000	5	60
Src	1:1000	5	60
ERK	1:1000	5	43
sekundarno protutijelo	1:10000	0,5	-

*Protutijela su razrijeđena u 5 mL 5%-tne otopine nemasnog mlijeka u TBST puferu

Istu je membranu moguće iskoristiti za detekciju više različitih proteina, ali svaki se put moraju iznova ukloniti stara i dodati nova protutijela. Prije uklanjanja protutijela s membrane (engl. *stripping*) membrana se kratko ispere u puferu TBST, a potom se inkubira 30 min u 100 mM glicinu. Prije inkubacije sljedećim protutijelom potrebno je ponovo blokirati membrane u TBST puferu s 10% nemasnog mlijeka tijekom 30 minuta.

3.2.7. Računanje kombinacijskog indeksa (CI)

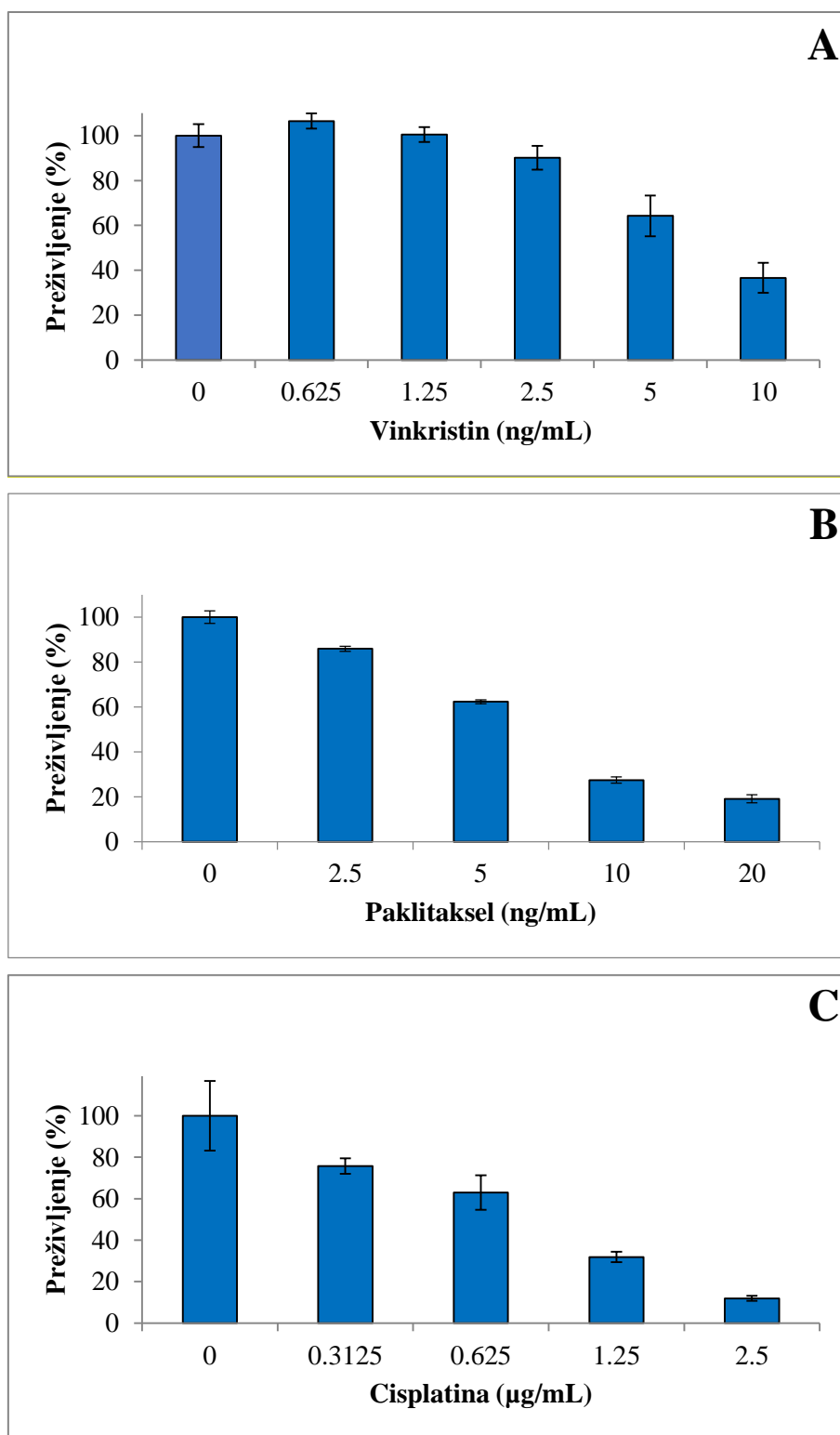
Kombinacijski indeks se koristi za opisivanje međusobne interakcije citotoksičnih spojeva koji mogu imati sinergistički, antagonistički ili aditivni učinak. Izračun kombinacijskog indeksa (engl. *combination index*, CI) temelji se na Chou-Talalay teoremu. Vrijednosti kombinacijskog indeksa 1 ($CI=1$) upućuju na aditivni učinak, vrijednosti manje od 1 ($CI<1$) upućuju na sinergistički učinak dok vrijednosti veće od 1 ($CI>1$) upućuju na antagonistički učinak. Za izračun kombinacijskog indeksa potrebno je utvrditi citotoksičnost svakog od ispitivanih lijekova posebno, te više kombinacija dvaju spojeva, a to je u ovom radu učinjeno testom MTT. Za potrebe računanja indeksa korišten je računalni program CompuSyn.

4. REZULTATI

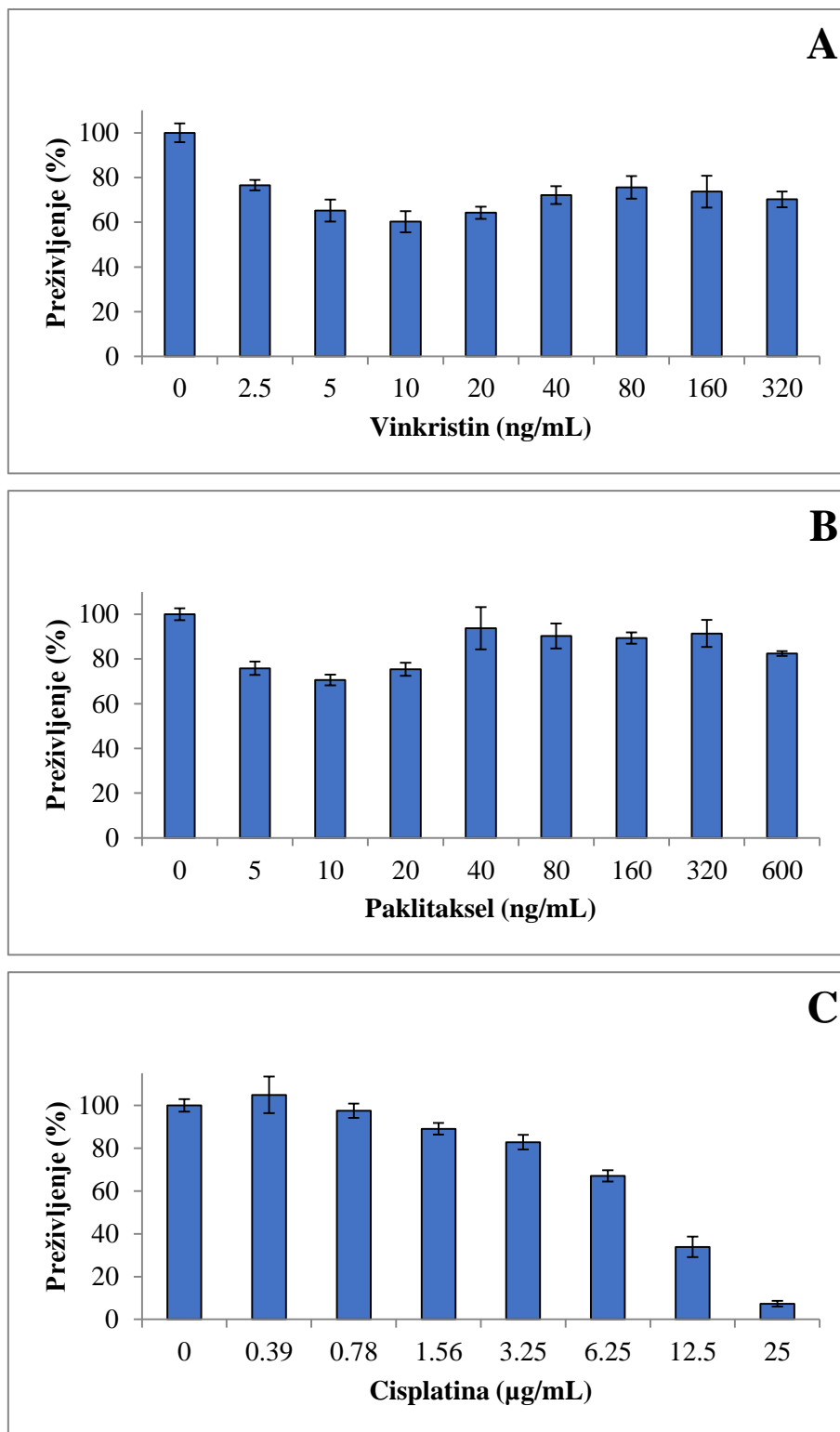
4.1. Stanične linije melanoma imaju različitu osjetljivost na vinkristin, paklitaksel i cisplatinu

Kako bismo utvrdili osjetljivost staničnih linija RPMI-7951, SK-MEL-3, MeWo i A375 na protutumorske lijekove vinkristin, paklitaksel i cisplatinu, mjerili smo preživljenje stanica MTT testom nakon njihovog izlaganja različitim koncentracijama navedenih spojeva. Rezultati MTT testa prikazani su kao postotak preživljenja stanica izloženih djelovanju citostatika u odnosu na kontrolne stanice.

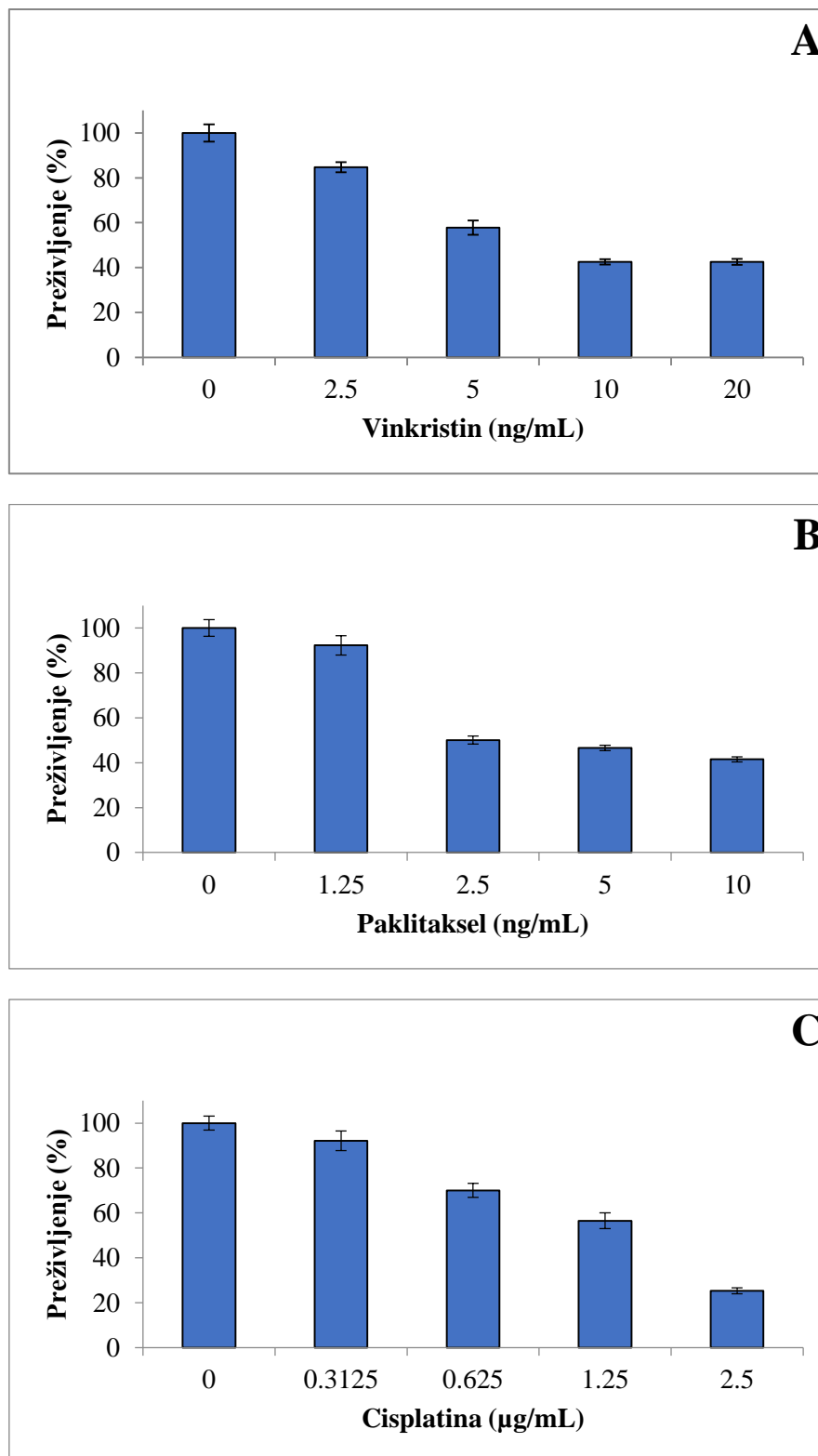
Rezultati prikazani na slici 7 pokazuju da su stanice RPMI-7951 osjetljive na djelovanje vinkristina, paklitaksela i cisplatine. Istim spojevima izložili smo i stanice SK-MEL-3. Iz rezultata prikazanih na slici 8 može se zaključiti da su ove stanice otporne na djelovanje vinkristina i paklitaksela jer povećanjem doze nije bilo moguće postići citotoksični učinak. Stanice SK-MEL-3 osjetljive su na cisplatinu, ali je koncentracija potrebna za postizanje citotoksičnog učinka oko 10 puta veća nego za stanice RPMI-7951 pa ih prema tome smatramo otpornim i na cisplatinu. Na slici 9 prikazani su rezultati osjetljivosti stanične linije MeWo na vinkristin, paklitaksel i cisplatinu. Iz prikazanih rezultata se vidi da su stanice osjetljive na sva tri protutumorska lijeka. Slika 10 prikazuje rezultate osjetljivosti stanica A375 na djelovanje vinkristina, paklitaksela i cisplatine. Rezultati ukazuju na to da su stanice osjetljive na djelovanje vinkristina i paklitaksela samo pri visokim koncentracijama čime ih smatramo otpornima na oba protututumorska lijeka. Stanice A375 osjetljive su na citotoskično djelovanje cisplatine.



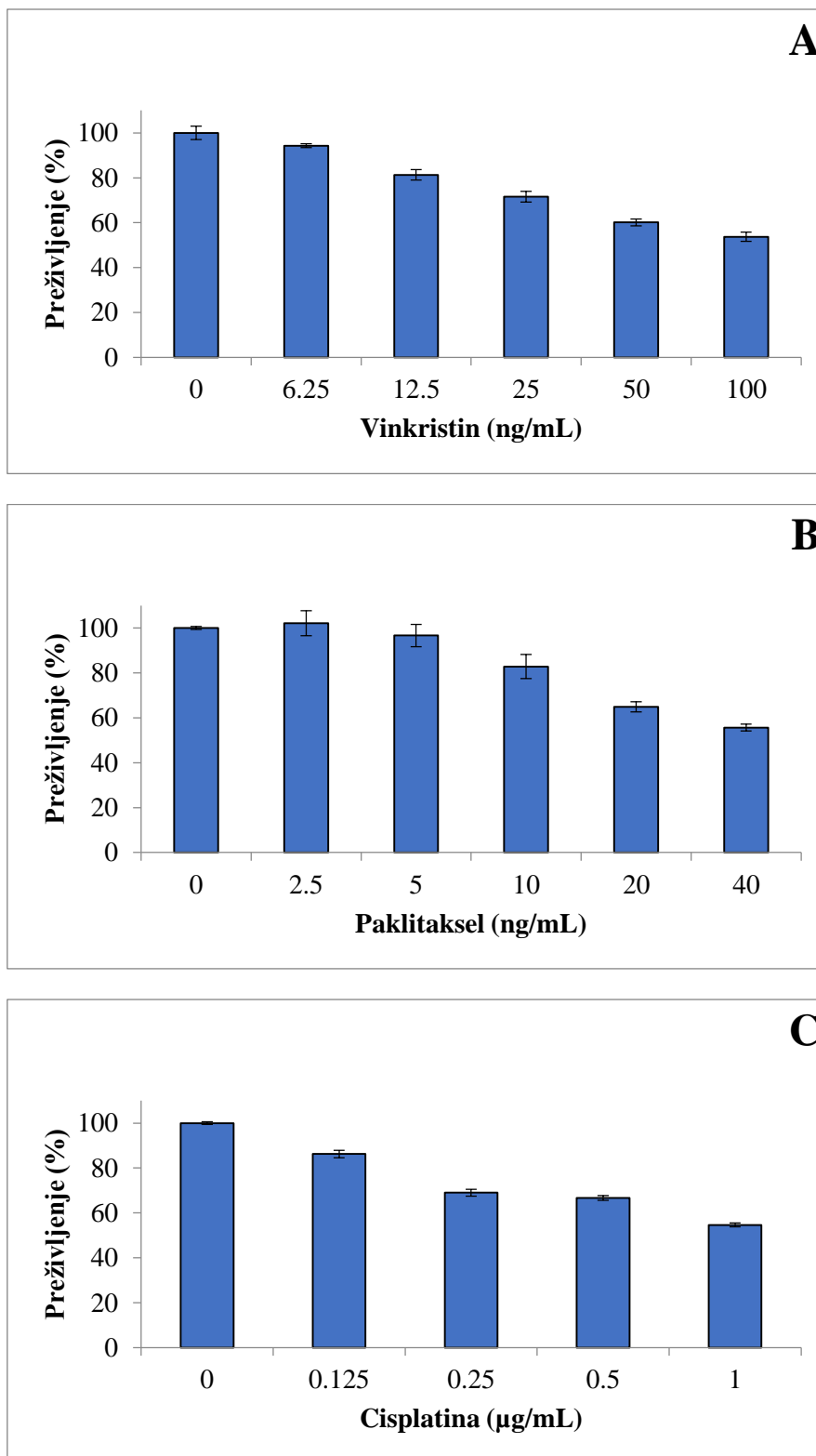
Slika 7. Osjetljivost stanica RPMI-7951 na: vinkristin (A), paklitaksel (B) i cisplatinu (C). Stanice RPMI-7951 (1×10^4 po bunariću) su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.



Slika 8. Osjetljivost stanica SK-MEL-3 na: vinkristin (A), paklitaksel (B) i cisplatinu (C). Stanice SK-MEL-3 (5×10^3 po bunariću) su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasadićvanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jedinog napravljenog pokusa.



Slika 9. Osjetljivost stanica MeWo na: vinkristin (A), paklitaksel (B) i cisplatinu (C). Stanice MeWo (1×10^4 po bunariću) su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasadićivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od dva pokusa sa sličnim rezultatima.

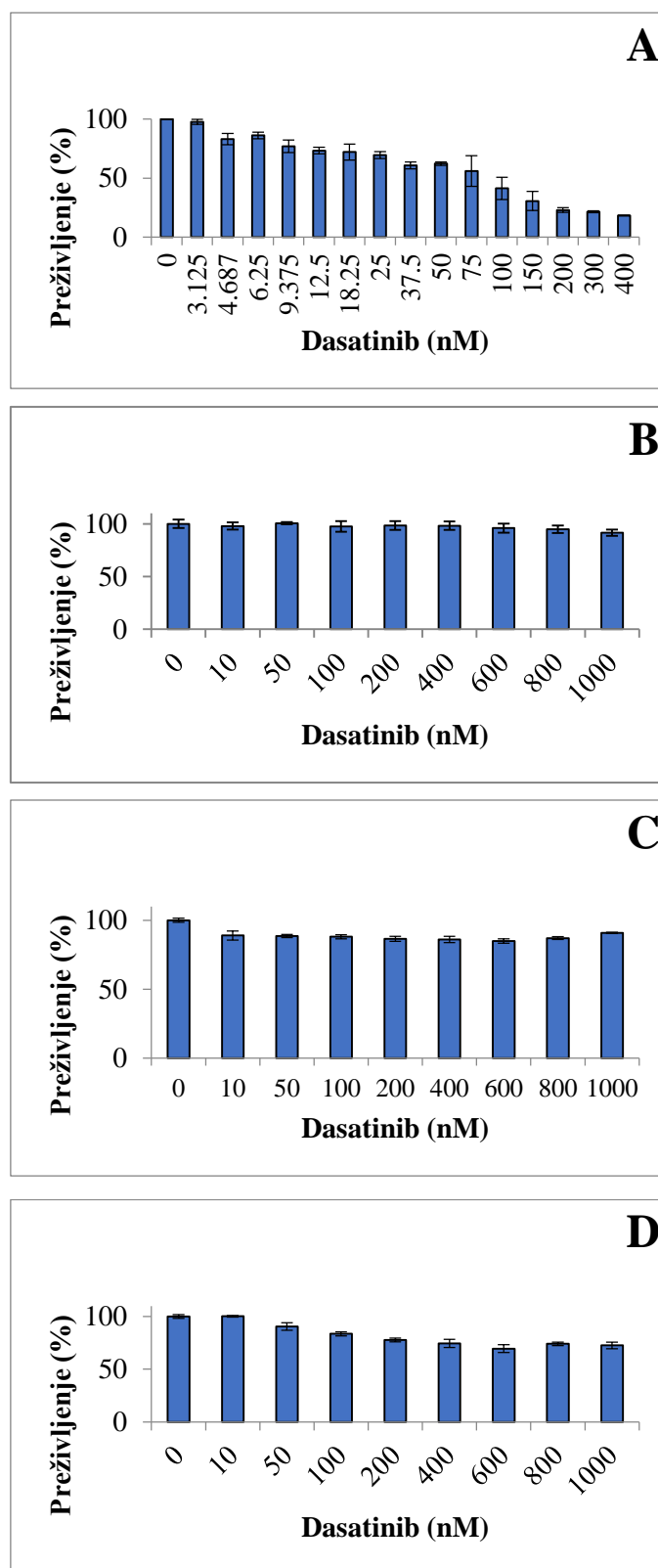


Slika 10. Osjetljivost stanica A375 na: vinkristin (A), paklitaksel (B) i cisplatinu (C). Stanice A375 (5×10^3 po bunariću) su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja protutumorskih lijekova određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jedinog napravljenog pokusa.

4.2. Stanična linija melanoma RPMI-7951 osjetljiva je na dasatinib za razliku od staničnih linija melanoma SK-MEL-3, MeWo i A375

Dasatinib je inhibitor tirozinskih kinaza. Prvenstveno je to inhibitor tirozinskih kinaza Src(Y418) i Bcr-Abl (Philadelphia kromosom), a odobren je kao terapija za oboljele od kronične mijeloične leukemije (CML) i Philadelphia kromosom pozitivne akutne limfoblastične leukemije. Ovaj je lijek trenutno u kliničkim ispitivanjima koja bi trebala odgovoriti na pitanje može li se dasatinib koristiti i za druge tipove tumora, te je li moguća kombinacija dasatiniba i protutumorskih lijekova za liječenje tumora, pa tako i melanoma.

Budući da je cilj ovog rada na modelu staničnih linija melanoma utvrditi učinak kombinirane terapije dasatinibom i protutumorskim lijekovima paklitakselom, vinkristinom i cisplatinom, istražili smo jesu li ove stanice osjetljive na dasatinib. Kako bismo odgovorili na to pitanje izložili smo stanice RPMI-7951, SK-MEL-3, MeWo i A375 različitim koncentracijama dasatiniba te preživljenje mjerili MTT testom. Iz rezultata prikazanih na slici 11 zaključili smo da su stanice RPMI-7951 jako osjetljive na njegovo djelovanje već pri relativno niskim koncentracijama. Na temelju ovih rezultata odabrali smo koncentracije dasatiniba za daljnje pokuse utvrđivanja zajedničkog djelovanja dasatiniba i protutumorskih lijekova. Stanice SK-MEL-3 i MeWo pokazuju otpornost na djelovanje dasatiniba i to u koncentracijama koje su oko 10 puta veće (1000 nM) nego što je koncentracija dasatiniba koje smanjuju preživljenje stanica RPMI-7951. U stanicama A375 dasatinib je smanjivao preživljenje na 80% već u koncentraciji od 200 nM, međutim povećanje koncentracije dasatiniba sve do 1000 nM nije dovelo do statistički značajnog povećanja citotoksičnog učinka.

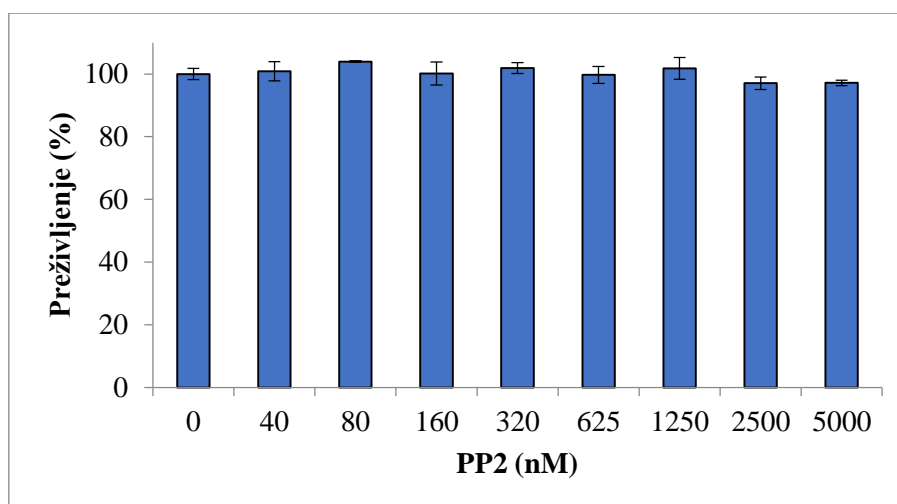


Slika 11. Osjetljivost stanica RPMI-7951 (A), SK-MEL-3 (B), MeWo (C) i A375 (D) na dasatinib. Stanice RPMI-7951 (1×10^4 po bunariću), SK-MEL-3 (5×10^3 po bunariću), MeWo (1×10^4 po bunariću) i A375 (5×10^3 po bunariću) nasađene su u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije dasatiniba. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja dasatiniba određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od 2 pokusa sa sličnim rezultatima.

4.3. Stanična linija melanoma RPMI-7951 nije osjetljiva na PP2

PP2 je inhibitor tirozinskih kinaza čiji se mete djelomično preklapaju sa dasatinibom. Prvenstveno je zajednička meta nereceptorska tirozinska kinaza Src. Kako bi utvrdili je li inhibicija tirozinske kinaze Src uzrok osjetljivosti stanične linije RPMI-7951 na dasatinib, odlučili smo istražiti osjetljivost iste stanične linije na inhibitor PP2.

Stanice RPMI-7951 izložili smo djelovanju širokog raspona koncentracija PP2 i podvrgli MTT testu. Na temelju rezultata prikazanog na slici 12 zaključili smo da stanice RPMI-7951 nisu osjetljive na njegovo djelovanje ni pri vrlo visokim koncentracijama. Stoga smo pretpostavili da dasatinib u stanicama RPMI-7951 vrlo vjerojatno ne djeluje na tirozinsku kinazu Src već na neku drugu, nama nepoznatu molekulu.

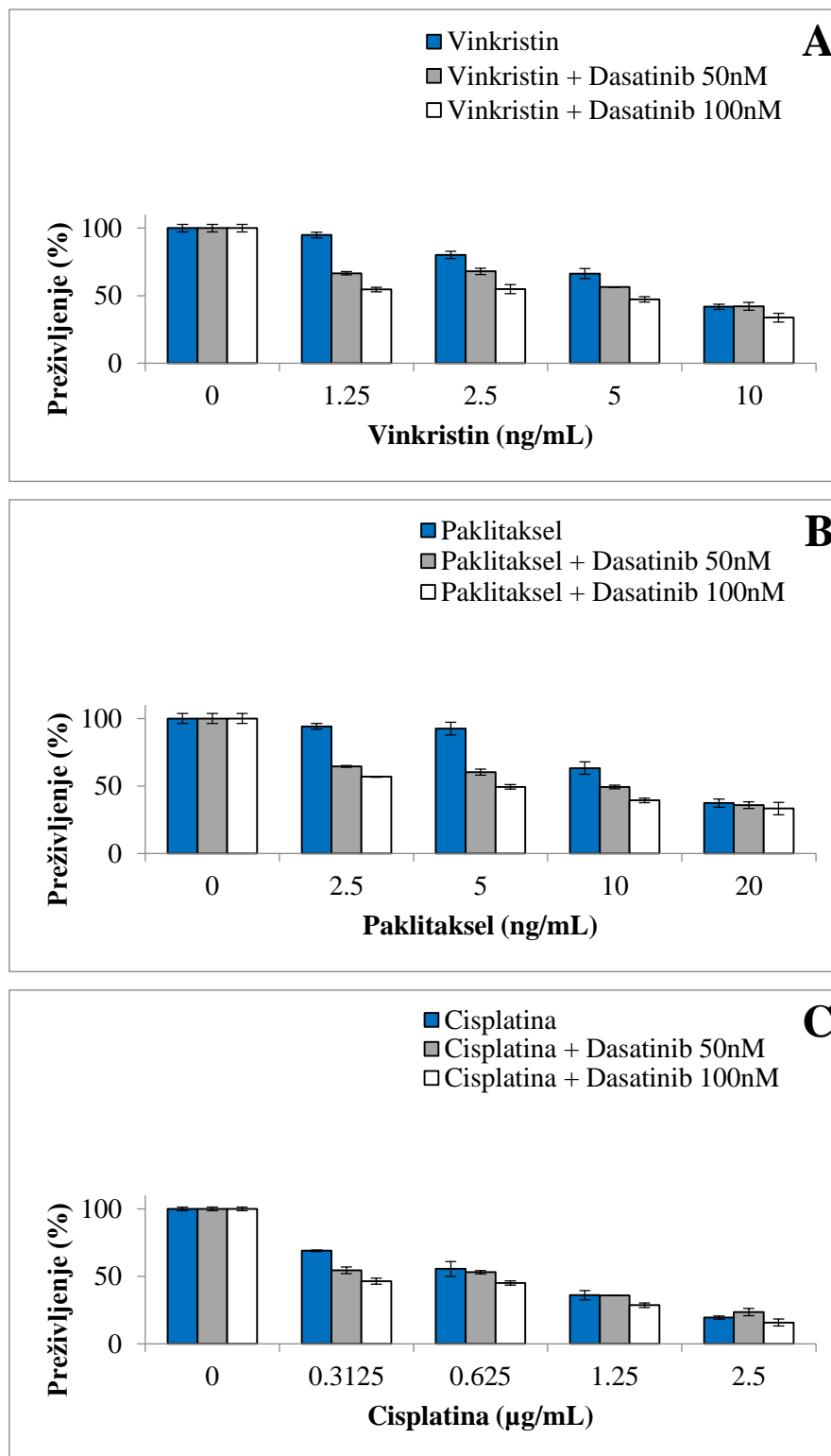


Slika 12. Osjetljivost stanica RPMI-7951 na PP2. Stanice RPMI-7951 (1×10^4 po bunariću) nasadene su u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije PP2. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja PP2 određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

4.4. Istovremeno izlaganje stanica RPMI-7951 dasatinibu i protutumorskim lijekovima pokazuje antagonistički učinak

Većina današnjih protutumorskih terapija temelji se na kombinaciji nekoliko lijekova. Ciljevi takve strategije su uzajamno pojačavanje terapijskih učinaka lijekova, smanjenje nuspojava i odgađanje ili sprječavanje pojave otpornosti tumora. Sinergizam podrazumijeva da je kombinacija lijekova učinkovitija od sume njihovih pojedinačnih učinaka, dok je u slučaju antagonizma kombinacija manje učinkovita. Jedan od najčešće korištenih načina ispitivanja kombinacije je određivanje kombinacijskog indeksa (CI). Pomoću računalnog programa CalcuSyn može se izračunati CI na temelju podataka o djelovanju svakog od ispitivanih spojeva zasebno i u kombinaciji.

Na stanicama RPMI-7951 ispitivano je kombinacijsko djelovanje dasatiniba i svakog od tri citostatika, vinkristina, paklitaksela i cisplatine. Iz rezultata na slici 13 i tablici 10 vidljivo je da su stanice osjetljive na kombinacije, ali prema vrijednosti CI koje su znatno veće od 1 jasno je da imaju međusobni antagonistički učinak.



Slika 13. Osjetljivost stanica RPMI-7951 na kombinaciju: dasatiniba i vinkristina (A), dasatiniba i paklitaksela (B), dasatiniba i cisplatine (C). Stanice RPMI-7951 (1×10^4 po bunariću) nasađene su u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasađivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije dasatiniba i protutumorskih lijekova. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja spojeva određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

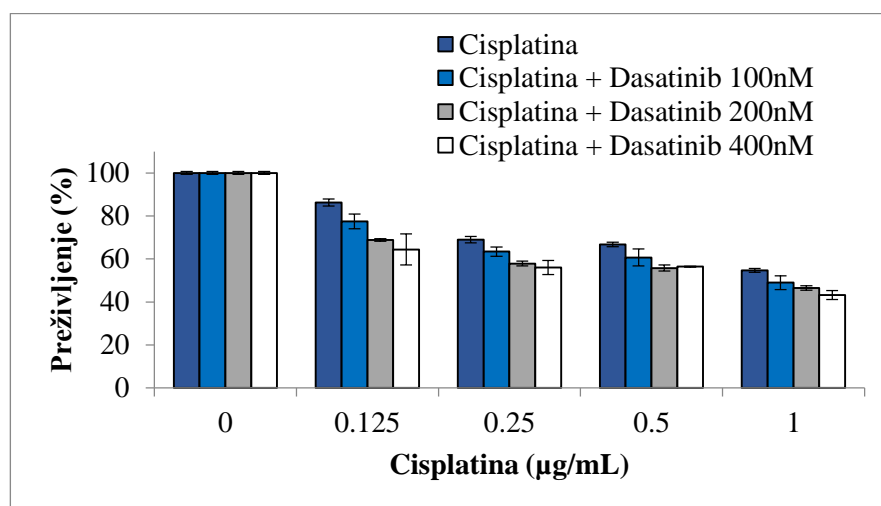
Tablica 10. CI* vrijednosti za različite kombinacije dasatiniba i protutumorskih lijekova u staničnoj liniji RPMI-7951.

	Dasatinib (50 nM)	Dasatinib (100 nM)
Vinkristin (2,5 ng/mL)	1,42863	1,48011
Vinkristin (5 ng/mL)	1,35806	1,46235
Paklitaksel (10 ng/mL)	1,13452	1,36675
Paklitaksel (20 ng/mL)	1,33379	1,65429
Cisplatina (0,625 µg/mL)	1,51765	1,67348
Cisplatina (1,25 µg/mL)	1,43796	1,48942

*CI: kombinacijski indeks (engl. *combination index*)

4.5. Istovremeno izlaganje stanica A375 dasatinibu i cisplatini pokazuje sinergistički učinak

U ovom smo radu istraživali učinak dasatiniba na četiri stanične linije melanoma i utvrdili da je osim RPMI-7951, koja je osjetljiva na male doze dasatiniba, stanična linija A375 umjereno osjetljiva na male doze dasatiniba te da se citotoksični učinak ne može povećati izlaganjem višim dozama. Budući da se ova stanična linija pokazala osjetljivom jedino na citotoksično djelovanje ciplatine, na njoj smo ispitali i kombinirano djelovanje dasatiniba i cisplatine (slika 14 i tablica 11). Ovi rezultati upućuju na sinergistički utjecaj među ispitivanim spojevima.



Slika 14. Osjetljivost stanica A375 na kombinaciju dasatiniba i cisplatine. Stanice A375 (5×10^3 po bunariću) nasadene su u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasadivanja u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije dasatiniba i cisplatine. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja spojeva određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan rezultat jedinog napravljenog pokusa.

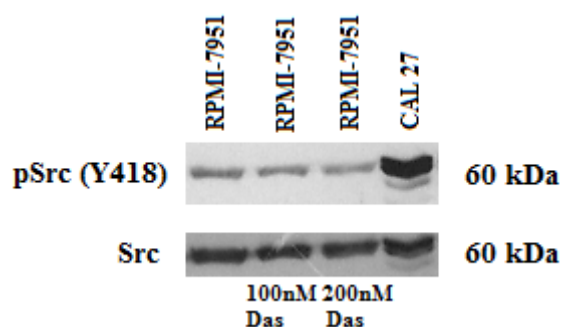
Tablica 11. CI* vrijednosti različitih kombinacija dasatiniba i cisplatine za staničnu liniju A375.

	Dasatinib (200 nM)	Dasatinib (400 nM)
Cisplatina (0,5 µg/mL)	0,52677	0,61595
Cisplatina (1 µg/mL)	0,43581	0,34563

*CI: kombinacijski indeks (engl. *combination index*)

4.6. Utvrđivanje ukupne količine pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951 osjetljivim na dasatinib

Jedna od glavnih meta dasatiniba uz BCR-Abl, c-KIT i receptor za efrin, je pSrc(Y418). Dasatinib je mala molekula koja inhibira fosforilaciju tirozina 418 (Y418). Na temelju prethodno izloženih rezultata osjetljivosti stanica RPMI-7951 na dasatinib i neosjetljivosti na drugi, nešto specifičniji, inhibitor PP2 pretpostavili smo da pSrc(Y418) vrlo vjerojatno nije ciljna molekula u stanicama RPMI-7951. Kako bismo potvrdili ovu pretpostavku odredili smo količinu proteina Src / pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951, prije i nakon izlaganja djelovanju dasatiniba koncentracija 100 i 200 nM, za koje je prethodno jasno pokazano djelovanje na preživljenje. Mjerenje je izvedeno šest sati nakon dodatka dasatiniba, kada smo ukupne proteine stanice razdvojili pomoću metode SDS-PAGE, a količinu Src i pSrc(Y418) odredili metodom Western blot koristeći protutijela specifična za Src i pSrc(Y418) (slika 15). Kao pozitivna kontrola u ovom eksperimentu korištene su stanice karcinoma pločastog epitela jezika (Cal27) za koje je, u laboratoriju u kojem je ovaj rad izrađen, pokazano da eksprimiraju Src i pSrc(Y418), te da je inhibicija pSrc(Y418) dasatinibom učinkovita (Stojanović i sur. 2016). Iz rezultata na slici 15 može se zaključiti da stanice RPMI-7951, u usporedbi s stanicama Cal27, eksprimiraju usporedivu količinu ukupnog Src. Međutim, u stanicama RPMI-7951 u usporedbi sa stanicama Cal27 nalazi se vrlo mala količina pSrc(Y418). Izlaganje stanica RPMI-7951 dasatinibu, bez obzira na koncentraciju, nije utjecalo na količinu pSrc(Y418) što dodatno potvrđuje i denzitometrijska analiza (rezultati nisu prikazani). Međutim, istovremena obrada stanica RPMI-7951 istim koncentracijama dasatiniba znatno smanjuje preživljenje ukazujući da dasatinib u tim koncentracijama nalazi ciljne molekule unutar stanice. Kako pSrc(Y418) nije jedina, nego samo jedna od ciljnih molekula djelovanja dasatiniba, te kako je ukupna količina fosforiliriranog Src(Y418) vrlo malena u usporedbi s pozitivnom kontrolom stanica Cal27, pretpostavljamo da je to uzrok zašto ne vidimo smanjenje ukupne količine pSrc(Y418). Na temelju ovih podataka i prethodno dobivenog rezultata koji pokazuje da su stanice RPMI-7951 neosjetljive na drugi, nešto specifičniji inhibitor pSrc(Y418) PP2, pretpostavljamo da u stanicama RPMI-7951 pSrc(Y418) nije ciljna molekula dasatiniba. Kako potencijalnih ciljnih molekula za dasatinib ima jako mnogo, u ovom radu nismo dalje za njima tragali.



Slika 15. Količina Src i pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951 i Cal27. Stanice su nasadene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata na stanice je dodan dasatinib (100 i 200 nM) te su 6 sati nakon toga skupljeni uzorci. Ekspresija Src i pSrc(Y418) utvrđena je metodom SDS-PAGE i Western blot pomoću protutijela specifičnih za pSrc(Y418) i Src te odgovarajućih sekundarnih protutijela obilježenih enzimom peroksidaza. Detekcija je izvršena pomoću kemiluminiscentnog reagensa i izlaganjem membrane fotografskom filmu. Na slici je prikazan rezultat jedinog napravljenog pokusa.

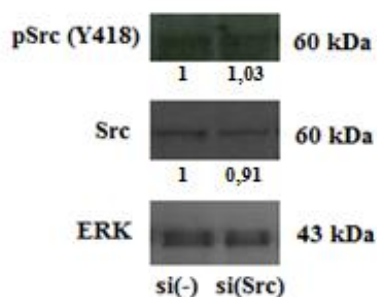
4.7. Utišavanje ekspresije Src u stanicama RPMI-7951 ne imitira učinak dasatiniba na osjetljivost na protutumorske lijekove

Kako bismo još jednom potvrdili hipotezu da citotoksični učinak dasatiniba u stanicama RPMI-7951 nije posljedica djelovanja na pSrc(Y418) odlučili smo utišati ekspresiju gena koji kodira taj protein i odrediti utjecaj utišavanja na osjetljivost na tri protutumorska lijeka, vinkristin, paklitaksel i cisplatinu. Utišavanje smo proveli transfekcijom malim interferirajućim RNA (siRNA) specifičnim za Src uz pomoć komercijalno dostupnog kompleta za transfekciju liposomima, te kao kontrolu koristili nespecifičnu siRNA. Pretpostavili smo da će utišavanje ukupne količine Src smanjiti i količinu fosforiliranog pSrc(Y418), te da će u slučaju da dasatinib djeluje preko mete pSrc(Y418) izlaganje protutumorskim lijekovima stanica RPMI-7951 s utišanim Src, usporedbom s kontrolnim stanicama transficiranim nespecifičnom siRNA, pokazivati smanjenje djelovanja protutumorskog lijeka.

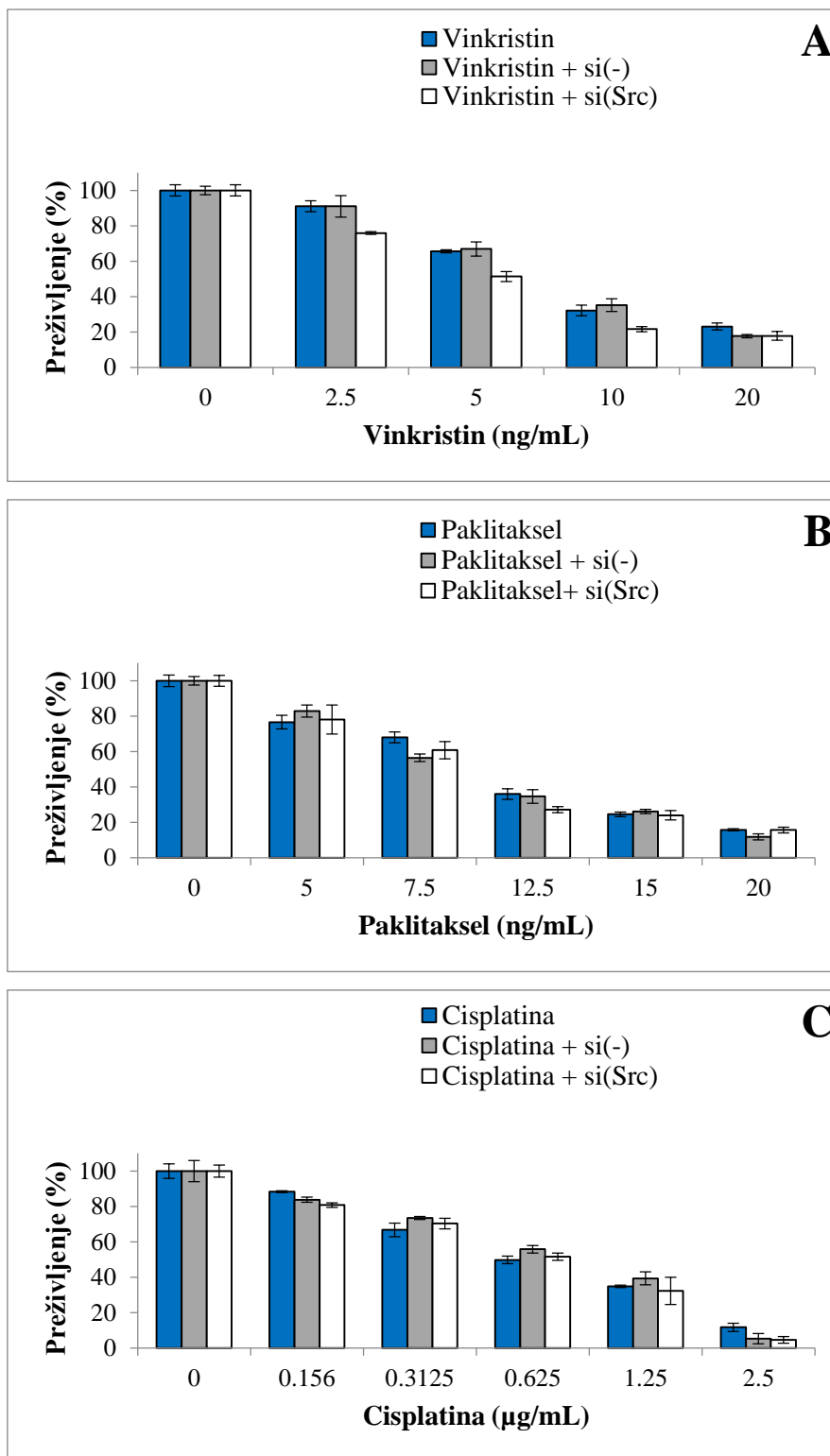
Kako bismo provjerili uspješnost utišavanja mjerili smo ekspresiju Src i pSrc prema ekspresiji ERK, metodom SDS-PAGE i Western blot. Iz rezultata prikazanih na slici 16 zaključujemo da je utišavanje ukupne količine Src bilo vrlo slabo (prema rezultatima denzitometrije postignuto je utišavanje za samo 9%). U ovom smo eksperimentu pretpostavili da ćemo utišavanjem ukupne količine Src u stanici smanjiti i količinu pSrc(Y418). Prema rezultatima denzitometrije ukupna je količina pSrc(Y418) je nepromijenjena. S obzirom na činjenicu da smo SDS-PAGE i Western blot napravili samo jednom moguće je i da je u tom pokusu utišavanje uistinu bilo vrlo slabo. Međutim, rezultati MTT testa iz ovog pokusa u potpunosti se slažu s rezultatima druga dva pokusa u kojima smo utišavali Src i mjerili osjetljivost na protutumorske lijekove MTT testom (slika 17). Konačno, Western blot metoda je semikvantitativne prirode, a ukupna količina pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951 je iznimno mala što još više otežava mjerenje.

Iako smo mjerenje ukupne količine Src nakon utišavanja pomoću Src-specifične siRNA učinili samo jednom, pokus utišavanja Src i određivanje osjetljivosti na protutumorske lijekove vinkristin, paklitaksel i cisplatinu ponovili smo tri puta i pri tome dobili jednak rezultat. Slika 17 prikazuje da utišavanje Src statistički značajno povećava osjetljivost stanica RPMI-7951 na vinkristin. Istovremeno, utišavanje Src nema nikakav utjecaj na osjetljivost stanica RPMI-7951 na paklitaksel i cisplatinu. Kako utišavanje Src ima suprotan utjecaj na osjetljivost na vinkristin

u usporedbi s dasatinibom i kako utišavanje Src nema utjecaja na osjetljivost na paklitaksel i cisplatinu, za razliku od antagonističkog utjecaja kombinacije dasatiniba sa paklitakselom i cispaltinom, zaključujemo da je ovaj rezultat još jedan dokaz da dasatinib u stanicama RPMI-7951 ne djeluje inhibicijom pSrc(Y418).



Slika 16. Količina Src, pSrc(Y418) i ERK u stanicama RPMI-7951 transficiranim s kontrolnom, nespecifičnom siRNA (si(-)) i siRNA specifičnom za Src (si(Src)). Stanice su nasađene u pločicu za uzgoj kulture stanica s 6 bunarića. Nakon 24 sata stanice su transficirane sa si(-) i si(Src). Četrdeset i osam sati nakon transfekcije skupljeni su uzorci. Ekspresija Src, pSrc(Y418) i ERK utvrđena je metodom SDS-PAGE i Western blot pomoću protutijela specifičnih za pSrc(Y418), Src i ERK te odgovarajućih sekundarnih protutijela obilježenih enzimom peroksidaza. Detekcija je izvršena pomoću kemiluminiscentnog reagensa i izlaganjem membrane fotografskom filmu. Brojevi predstavljaju vrijednosti relativne ekspresije prema si(-) dobivenu denzitometrijskom analizom vrpce prema ekspresiji jednoliko eksprimiranog proteina ERK. Na slici je prikazan rezultat jedinog napravljenog pokusa.



Slika 17. Osjetljivost stanica RPMI-7951 nakon utišavanja ekspresije tirozinske kinaze Src na: vinkristin (A), paklitaksel (B) i cisplatinu (C). Stanice RPMI-7951 (1×10^4 po bunariću) nasadene su 24 sata nakon transfekcije pomoću si(-) i si(Src) u pločicu za uzgoj kulture stanica s 96 bunarića. Dvadeset i četiri sata nakon nasadijanja (48 sati nakon utišavanja) u bunariće sa stanicama dodane su različite koncentracije citostatika. Sedamdeset i dva sata nakon dodavanja spojeva određeno je preživljenje stanica MTT testom. Na slici je prikazan jedan od tri pokusa sa sličnim rezultatima.

5. RASPRAVA

Za melanom je karakteristično rano pojavljivanje metastaza unatoč maloj veličini primarnog tumora (Tas 2012). Mnogi su proteini uključeni u metastaziranje melanoma (Smalley i Herlyn 2005; Xie i sur. 2006), ali do danas nije postignut značajan napredak u razvoju terapije koja bi spriječila metastaziranje. Najbolji rezultati postižu se imunoterapijom i inhibitorima kinaza BRAF/MEK, čime se značajno poboljšala prognoza pacijenata s metastatskim melanomom (Luke i Hodi 2013; Wolchok i sur. 2013). Međutim, ne reagiraju svi pacijenti na te terapije, a u slučaju terapije inhibitorima BRAF-a čest je razvoj otpornosti tumora koji se povezuje s alternativnim signalnim putevima kao što je signalni put Src (Girrotti i sur. 2013). Obitelj Src sudjeluje u prijenosu signala u mnogim signalnim putevima, a neki od njih su EGFR, HER2, PDGFR, FGFR i VEGFR. Kinaze Src uključene su u signalne puteve koji reguliraju rast stanica, adheziju, pokretljivost i invazivnost stanica (Yeatman 2004). Zbog navedenih razloga može se pretpostaviti da će blokiranje kinaze Src imati negativan utjecaj na preživljenje stanica melanoma.

Osnovni je cilj ovoga rada bio istražiti osjetljivost staničnih linija melanoma RPMI-7951, SK-MEL-3, MeWo i A375 na dasatinib, protutumorske lijekove paklitaksel, vinkristin i cisplatinu, te mogućnost istovremene primjene dasatiniba i jednog od spomenutih protutumorskih lijekova. Najosjetljivija stanična linija na paklitaksel, vinkristin i cisplatinu je RPMI-7951, slijedi ju stanična linija MeWo koja je gotovo jednako osjetljiva na sva tri protutumorska lijeka. Stanična linija SK-MEL-3 je pokazala otpornost na sva tri protutumorska lijeka s napomenom da se za vinkristin i paklitaksel nije mogao postići citotoksični učinak izlaganjem vrlo visokim dozama, dok je za cisplatinu citotoksični učinak postignut povećanjem doze za oko 10 puta u odnosu na osjetljive stanice RPMI-7951. Četvrta istraživana stanična linija melanoma A375 je osjetljiva na vinkristin i paklitaksel ali samo pri vrlo visokim dozama pa ju možemo smatrati otpornom, ali je osjetljiva na usporedive koncentracije cisplatine kao i stanične linije RPMI-7951 i MeWo. Utvrdili smo da su od 4 istraživane stanične linije melanoma jedino stanice RPMI-7951 osjetljive na dasatinib u koncentracijama koje su usporedive onima koje se postižu u serumu pacijenata koji primaju terapijske doze dasatiniba i koja iznosi oko 130 nM (Eustace i sur. 2014). U tim je stanicama u toj dozi primijećen izrazito snažan citotoksični učinak dasatiniba (preživljenje oko 35%), dok su stanice A375 vrlo slabo osjetljive na dasatinib istih tih koncentracija (preživljenje oko 80%), a osjetljivost se ne može

povećati primjenom veće doze. Kombinacija dasatiniba i svakog od tri istražena protutumorska lijeka u osjetljivim stanicama RPMI-7951 ima antagonistički učinak. I u stanicama A375 koje su vrlo slabo osjetljive na dasatinib istražili smo kombinirani učinak dasatiniba i cisplatine, jedinog protutumorskog lijeka na koje su ove stanice osjetljive u relativno niskim dozama, te je otkriven sinergistički učinak. Serijom pokusa u stanicama RPMI-7951, izlaganjem stanica drugom, specifičnijem inhibitoru pSrc(Y418) PP2 na koji stanice nisu bile osjetljive, mjerenjem ukupne količine Src i pSrc(Y418) koje je pokazalo vrlo malu količinu pSrc(Y418) u ovim stanicama, te utišavanjem Src pomoću transfekcije Src specifičnom siRNA što je dovelo to povećanja osjetljivosti na vinkristin što je suprotno djelovanju kombinacije dasatiniba i vinkristina, zaključili smo da pSrc(Y418) nije ciljna molekula na koju djeluje dasatinib. Prema tome zaključak ovoga rada je da se stanice melanoma razlikuju u osjetljivosti na dasatinib i protutumorske lijekove paklitaksel, vinkristin i cisplatinu, te da u stanicama izrazito osjetljivima na dasatinib kombinirana primjena dasatiniba s protutumorskim lijekovima paklitakselom, vinkristinom i cisplatinom ima antagonistički učinak što znači da pri istovremenoj upotrebi jedan lijek smanjuje djelovanje drugog. U ovom radu nismo otkrili identitet molekule čijom inhibicijom dolazi do citotoksičnog djelovanja dasatiniba. Svi ovi rezultati bi trebali biti potvrđeni na puno većem uzorku staničnih linija melanoma. Ipak, na temelju ovih rezultata zaključujemo da kombinacija dasatiniba s protutumorskim lijekovima vinkristinom, paklitakselom i cisplatinom nije pristup koji bi trebali razvijati za liječenje melanoma. Iako je u staničnoj liniji A375 pokazan blagi sinergistički učinak kombinacije dasatiniba i cisplatine, potencijal dasatiniba u ovoj staničnoj liniji je vrlo slab jer najveći citotoksični učinak dasatiniba ne prelazi 20% (80% preživljenje stanica bez obzira na povećanje doze). Vrlo je zanimljiv rezultat ovog istraživanja da dasatinib u stanicama RPMI-7951 ima izraziti citotoksični učinak, ali ne inhibicijom pSrc(Y418). To još jednom pokazuje kako je specifičnost dasatiniba, kao što je to slučaj s mnogim drugim inhibitorima koji su u fazi kliničkih ispitivanja ili već u klinici, relativno široka. Stoga bi otkrivanje mete na koju djeluje dasatinib u stanicama RPMI-7951 doprinjelo saznanjima o mogućoj upotrebi ovog inhibitora za liječenje tumora. Ovi rezultati bi doprinijeli i zajedničkim naporima mnogih istraživačkih grupa u potrazi za biomarkerima u tumorskim stanicama koji bi mogli predvidjeti osjetljivost stanica na dasatinib. Nažalost, takvi biomarkeri još uvijek nisu poznati.

Iz literature je poznato da su stanice melanoma izrazito otporne na djelovanje protutumorskih lijekova što upućuje na postojanje urođene otpornosti (Berger i sur. 1997). U ovom radu korištene su četiri stanične linije od kojih je jedna izrazito otporna, jedna umjereno

osjetljiva, a dvije osjetljive na tri protutumorska lijeka: paklitaksel, vinkristin i cisplatinu. Međutim čak i za osjetljive stanične linije RPMI-7951 i MeWo možemo reći da je za citotoksični učinak ovih protutumorskih lijekova potrebna nešto veća doza sva tri citostatika nego što se koristi za druge tipove tumora u analognom testu citotoksičnosti. Tako se primjerice na web stranici projekta „*The Cancer Genome Project*“ (<http://www.cancerrxgene.org/>) može vidjeti da je prosječna IC_{50} vrijednost (doza spoja koja uzrokuje preživljenje 50% stanica) za paklitaksel kod melanoma (60,62 ng/mL) skoro dvostruko veća od prosječne IC_{50} vrijednost za metastazirajuće tumore (38,68 ng/mL). Na istoj se stranici može pronaći i slična usporedba za cisplatinu, čija je prosječna IC_{50} vrijednost za melanome iznosi 4,8 µg/mL, dok primjerice za tumore pločastih stanica glave i vrata te tumore mokraćnog mjehura iznosi 3,72 µg/mL. To su sve razlozi zašto je potrebno istraživati mogućnosti kombinirane terapije, ne samo protutumorskih lijekova međusobno nego i ciljanih lijekova s protutumorskim lijekovima.

Dasatinib je inhibitor fosforilacije mnogih kinaza, no često se upotrebljava kao inhibitor pSrc(Y418). Eustace i suradnici (2008) istražili su utjecaj dasatiniba na 5 staničnih linija melanoma i pokazali da su dvije stanične linije HT144 i Lox-IMVI osjetljive, dok su tri stanične linije SK-MEL-28, SK-MEL-5 i Malme-3M otporne na djelovanje dasatiniba. Koncentracija dasatiniba potrebna za citotoksični učinak 50% za Lox-IMVI najniža je i iznosi oko 35 nM, što je usporedivo s koncentracijom potrebnom za citotoksični učinak 50% koju smo mi koristili u ovom radu za stanice RPMI-7951 i koja iznosi oko 100 nM. Isti autori istražili su i mogućnost kombinacije dasatiniba s temozolomidom i pokazali slabi sinergistički učinak. Naši rezultati na stanicama RPMI-7951 pokazali su antagonistički učinak za kombinaciju dasatiniba i sva tri ispitivana protutumorska lijeka paklitaksela, vinkristina i cisplatine. Prema vrijednostima CI antagonistički učinak je najslabiji za paklitaksel i mogao bi se klasificirati kao umjereni antagonizam (kada su vrijednosti CI između 1,2 i 1,45). Primijećeni je antagonizam nešto izraženiji za kombinaciju dasatiniba s vinkristinom i cisplatinom, ali se i dalje može svrstati u kategoriju umjerenog antagonizma. S druge strane, CI vrijednosti kombinacijskog djelovanja cisplatine i dasatiniba u stanicama A375 ukazuju na sinergistički efekt ova dva spoja.

Homs i suradnici (2009) također su istraživali u tri stanične linije melanoma A375, SK-MEL-5 i SK-MEL-28 osjetljivost na dasatinib i mogućnost kombinirane terapije s temozolomidom, paklitakselom i cisplatinom. Zanimljivo je da su ovi autori koristili znatno veće koncentracije dasatiniba nego drugi autori. Koncentracija dasatiniba u tom radu potrebna za 50% citotoksični učinak iznosila je od 3000 do 9000 nM što je 30 do 90 puta više nego

koncentracije korištene u našem radu (100 nM). Budući da nismo zapazili citotoksični učinak s 1000 nM dasatiniba, zaključili smo da je stanična linija SK-MEL-3 otporna na dasatinib. Postoji vjerojatnost da bi povećavanjem doze iznad 1000 nM primijetili citotoksični učinak, ali smatramo da to nema smisla jer je koncentracija dasatiniba koju je moguće postići u pacijenata u plazmi 130 nM (Eustace i sur. 2014). Homs i suradnici (2009) su pokazali sinergistički učinak dasatiniba s cisplatinom što je u suprotnosti s našim rezultatom dobivenim na staničnoj liniji melanoma RPMI-7951, a u skladu sa sinergizmom primijećenim kod stanične linije A375. Međutim, ovi su autori naglasili da je upravo zbog vrlo visoke koncentracije dasatiniba koju su koristili učinak dasatiniba najvjerojatnije posljedica njegovog djelovanja na druge ciljne molekule, a ne na pSrc(Y418). Autori su također napomenuli da kombinacija dasatiniba s paklitakselom i temozolomidom nije dala sinergistički učinak, a budući da rezultate nisu prikazali, nije poznato je li učinak aditivni ili antagonistički. Rad Tokuhisa i suradnika (2014) opisuje još jedno istraživanje kombiniranog djelovanja dasatiniba i protutumorskog lijeka. Ovi su autori na modelu 26 staničnih linija melanoma čovjeka pokazali sinergistički učinak dasatiniba i alkilirajućeg agensa melfalana, što su dodatno potvrdili i na modelu ksenografta u miševa, ali nisu istraživali koja je ciljana molekula djelovanja dasatiniba.

U literaturi nalazimo niz istraživanja kombinirane upotrebe dasatiniba i protutumorskih lijekova u različitim tipovima tumora. U nedavnom su istraživanju Perez i suradnici (2016) utvrdili da povišena razina pSrc(Y418) uzrokuje otpornost stanica kolorektalnog tumora na oksaliplatinu, ali ne i na 5-fluorouracil. U istom su radu utvrdili da izlaganje dasatinibu uzrokuje povećanje osjetljivosti na oksaliplatinu, ukoliko je u stanicama prisutna povišena razina fosforiliranog oblika Src (Y418), što ga čini dobrim prognostičkim markerom za liječenje kombiniranom terapijom dasatiniba i oksaliplatine. U nekoliko staničnih linija tumora jajnika dasatinib je uspješno kombiniran sa paklitakselom i karboplatinom (Teoh i sur. 2011; Le i sur. 2011), no napomena autora oba članka je potreba za pronalaskom markera pomoću kojih će se moći odrediti slučajevi u kojima ove terapije imaju smisla.

U literaturi nalazimo i istraživanja koja ukazuju na mogućnost uspješnog kombiniranja dasatiniba sa inhibitorima drugih kinaza. Tako su primjerice Park i suradnici (2012) primijetili da kombinirana terapija dasatinibom i rapamicinom, snažnim inhibitorom serin/treonin proteinske kinaze mTOR, daje jak sinergistički učinak u metastatskoj staničnoj liniji trostruko negativnog karcinoma dojke MDA-MB-231, dok je u Her2 pozitivnoj staničnoj liniji karcinoma dojke SK-BR-3 zabilježen sinergistički učinak kombinacije dasatiniba i sorafeniba, inhibitora

nekoliko tirozinskih kinaza kao što su VEGFR, PDGFR i RAF, iako je u ovim stanicama prvotno pokazana otpornost na terapiju samim dasatinibom (vrijednost IC_{50} iznosi 4000 nM). U modelu mišjih ksenografta stanične linije MDA-MB-231, Zeng i suradnici (2015) uspješno su primijenili liposome u koje su upakirali vinkristin i dasatinib, a meta terapije su bili tzv. kanali mimikrije stvaranja krvnih žila (engl. *vasculogenic mimicry (VM) channels*), fenomen koji se može definirati kao put opskrbe krvlju stanica tumora nastao od tumorskih stanica, neovisan o krvnim žilama građenim od endotelnih stanica. Ovakav pristup doveo je do pojačanog unosa vinkristina i dasatiniba u stanice, povećane indukcije apoptoze, povećanog nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta, produžena cirkulacija liposoma u krvotoku i pojačane akumulacije u tumorskom tkivu, i konačno povećanog terapijskog učinka te nestajanje VM kanala.

U ovom smo radu pokazali snažno citotoksično djelovanje dasatiniba u modelu stanica melanoma RPMI-7951, ali smo također pokazali da meta dasatiniba u ovim stanicama nije pSrc(Y418). Jedan od dokaza ove tvrdnje je neosjetljivost stanica RPMI-7951 na PP2 za koji se smatra da je specifičan inhibitor upravo pSrc(Y418). S obzirom na činjenicu da su se stanice pokazale otpornim na PP2 i pri vrlo visokim koncentracijama, pretpostavili smo da u stanicama RPMI-7951 dasatinib djeluje na druge ciljane molekule koje nisu pSrc(Y418), a potencijalni kandidati su BCR-Abl c-KIT, PDGFR i receptori efrin-A. Od spomenutih je meta za dasatinib svakako je najčešće spominjan fuzijski protein BCR-Abl čija je ekspresija karakteristična za kroničnu mijeloičnu leukemiju i za čije je liječenje dasatinib prvotno i odobren (Aguilera i Tisemberidou 2009). Osim toga, završena je druga faza kliničkog ispitivanja dasatiniba kao inhibitora tirozinske kinaze c-KIT kod pacijenata oboljelih od metastatskog adenoidnog cističnog karcinoma žlijezda slinovnica kod kojeg u oko 90% slučajeva dolazi do ekspresije upravo te kinaze (Wong i sur. 2016). Zaključak ove studije je taj da je u 50% pacijenata došlo do stagnacije bolesti u trajanju od 3 do 16 mjeseci te da pacijenti relativno dobro podnose dasatinib što se tiče nuspojava. Drugu kliničku studiju, u kojoj je korišten dasatinib upravo zahvaljujući sposobnosti inhibicije više različitih kinaza, završili su Chee i sur. (2013) na pacijentima oboljelim od duktalnog adenokarcinoma gušterače, vrsti tumora kod koje vrlo često dolazi do deregulacije Src, EphA2 te PDGFR α i β . Nažalost, prosječno preživljenje pacijenata uključenih u ovu studiju iznosilo je samo 4,7 mjeseci, što ukazuje na to da terapija samim dasatinibom nije dobar izbor u liječenju ove vrste tumora.

U staničnoj liniji RPMI-7951 odredili smo ekspresiju Src i pSrc(Y418) metodom SDS-PAGE i Western blot usporedivši je s ekspresijom Src i pSrc(Y418) u staničnoj liniji karcinoma pločastog epitela jezika Cal27 u kojoj je pokazana uloga pSrc(Y418) u osjetljivosti stanica na četiri različita protutumorska lijeka (između kojih je i cisplatina) i u kojoj je pokazano da izlaganje dasatinibu smanjuje ekspresiju pSrc(Y418) (Stojanović i sur. 2016). Utvrdili smo da je ekspresija Src usporediva između ove dvije stanične linije, dok je ekspresija pSrc(Y418) u stanicama RPMI-7951 značajno manja nego u stanicama Cal27. Ovaj podatak da u staničnoj liniji RPMI-7951 ima vrlo mala količina aktivne forme pSrc(Y418) u skladu je s odsutnim smanjenjem količine pSrc(Y418) nakon izlaganja dasatinibu i pretpostavkom da inhibicija pSrc(Y418) nije uzrok osjetljivosti ovih stanica na dasatinib. Kako bismo potvrdili tu pretpostavku, izveli smo niz eksperimenata sa stanicama RPMI-7951 u kojima smo pomoću malih interferirajućih RNA utišali ekspresiju proteina Src. Takve smo stanice zatim izložili djelovanju vinkristina, paklitaksela i cisplatine. Dobiveni rezultati povećanja osjetljivosti na vinkristin, te nepromijenjena osjetljivost na paklitaksel i cisplatinu, potvrđuju našu pretpostavku da Src(Y418) nije ciljna molekula dasatiniba. Uspješnost samog utišavanja pokazala se vrlo slabom budući da je ukupna količina Src u odnosu na kontrolu pala za samo 9%, dok je količina pSrc(Y418) ostala nepromijenjena. Međutim, iz rezultata dobivenih u laboratoriju u kojem je ovaj rad izrađen poznato je da je utišavanje Src pomoću u ovom radu korištene siRNA uspješno, ali je ipak manje učinkovitosti od siRNA za mnoge druge gene (Stojanović i sur. 2016). Čimbenici koji određuju učinkovitost siRNA su mnogobrojni i prelaze okvire rasprave u ovom radu. Ipak, za proteine koji u stanici postoje u osnovnom obliku (Src) i fosforiliranom, aktivnom obliku (pSrc(Y418)) treba imati na umu da pri utišavanju transfekcijom siRNA smanjujemo ekspresiju osnovnog oblika Src, a ne fosforiliranog oblika pSrc(Y418). Međutim, u modelu stanica Cal27 pokazano je da se smanjenjem ukupne količine Src uistinu može smanjiti i količina pSrc(Y418) koji je zapravo i aktivni oblik ovog proteina u prijenosu signala u različitim signalnim putevima (vrlo vjerojatno pomak ravnoteže između Src/pSrc(Y418)) (Stojanović i sur. 2016). U modelu stanica RPMI-7951 korištenom u ovom radu ukupna je količina pSrc(Y418) puno manja od one u stanicama Cal27, te je na rubu osjetljivosti metode SDS-PAGE i Western blot pa upotrebom ove metode ne možemo sa sigurnošću tvrditi je li došlo do promjene količine pSrc(Y418) u stanici. Istovremeno ne postoji bolja metoda koja bi se u tu svrhu mogla primijeniti. Prema tome, puno je informativniji rezultat mjerenja osjetljivosti stanica na protutumorske lijekove nakon utišavanja Src transfekcijom Src specifičnom siRNA dobiven MTT testom, a koji pokazuje potpuno drugačije rezultate od onih dobivenih kombiniranim djelovanjem dasatiniba i protutumorskih lijekova, potvrđujući još

jednom našu pretpostavku da dasatinib u stanicama RPMI-7951 ne djeluje putem inhibicije pSrc(Y418).

Aktivirani Src pSrc(Y418) nije pronađen u stanicama normalnih melanocita, dok je pronađen u 61% uzoraka melanoma. Ovaj podatak ukazuje da bi pSrc(Y418) mogao imati važnu ulogu u nastanku i razvoju melanoma (Homsy i sur. 2009). Za dasatinib je pokazano da posjeduje antiproliferativne i antiinvazivne učinke u staničnim linijama melanoma. Iako je glavna meta dasatiniba pSrc(Y418), pokazalo se da ni mjerenje ekspresije niti fosforilacije Src(Y418) nisu prediktivni faktor za odgovor na dasatinib u stanicama melanoma (Buettner i sur. 2008). Pokazano je i da izlaganje dasatinibu smanjuje količinu pSrc(Y418) bez obzira jesu li stanice osjetljive ili otporne na dasatinib. To upućuje na zaključak da inhibicija pSrc(Y418) ne predviđa citotoksični učinak izlaganju dasatinibu (Eustace i sur. 2014). Više je predkliničkih studija pokazalo da nizvodne molekule signalnog puta Src mogu predvidjeti odgovor na dasatinib tumora dojke, jajnika i prostate (Huang i sur. 2007; Wang i sur. 2007; Konecny i sur. 2009). Stoga su Eustace i suradnici (2014) pokušali analizom ekspresije više različitih proteina u stanicama melanoma pronaći prediktivne faktore za djelovanje dasatiniba. Dasatinib je inhibirao rast triju staničnih linija melanoma (Lox-IMVI, WM-115 i HT144) od ukupno 8 ispitivanih linija. Pronašli su korelaciju ekspresije ANXA1, CAV-1 and EphA2 na razini proteina s odgovorom na dasatinib. Pacijenti kod kojih je prisutna povišena razina ekspresija ovih proteina čine populaciju koja bi mogla imati koristi od liječenja dasatinibom.

Klinički pokus faze I u kome je istražena mogućnost upotrebe dasatiniba u kombinaciji s dakarbazinom, alkilirajućim protutumorskim lijekom, u pacijenata s uznapredovalim melanomom završen je 2012. godine (Algazi i sur. 2012). Pokazano je da je djelotvornost kombinirane primjene ovih dvaju lijekova veća nego svakog od lijekova posebno. Na temelju dobivenih rezultata u ovom kliničkom pokusu može se pretpostaviti da kombinacija dasatiniba i dakarbazina može smanjiti diseminaciju melanomskih lezija, što je u skladu s primijećenim smanjenjem migracije i invazije kao posljedica djelovanja dasatiniba u predkliničkim studijama (Eustace i sur. 2008, 2014). Konačno, pozitivni rezultati kombinacije dasatiniba i dakarbazina podržavaju daljnja istraživanja statusa molekula BRAF/NRAS/KIT kao potencijalnih biomarkera koji bi mogli pomoći u odabiru pacijenata koji bi mogli imati koristi od kombinirane terapije dasatinibom i dakarbazinom (Algazi i sur. 2012). Trenutno je u tijeku nekoliko kliničkih studija koje ispituju učinak dasatiniba u različitim kombinacijama u liječenju melanoma. Istovremeno se dasatinib u različitim kombinacijama, sa protutumorskim

lijekovima ili specifičnim inhibitorima molekula karakterističnim za pojedini tip tumora, aktivno istražuje u kliničkim pokusima za različite tumore (<https://clinicaltrials.gov>).

Rezultati dobiveni u ovom radu upućuju na potrebu dodatnih istraživanja kombiniranog djelovanja dasatiniba s protutumorskim lijekovima na stanice melanoma, te otkrivanje prediktivnih biomarkera pomoću kojih će se moći za svakog pacijenta pretpostaviti svrsishodnost liječenja dasatinibom i/ili kombinacijom s protutumorskim lijekovima.

6. ZAKLJUČCI

1. U modelu četiri stanične linije melanoma (RPMI-7951, SK-MEL-3, MeWo i A375) istražena je osjetljivost na vinkristin, paklitaksel i cisplatinu te je pokazano da su dvije stanične linije (RPMI-7951 i MeWo) osjetljive na ove protutumorske spojeve, dok su druge dvije (SK-MEL-3 i A375) na njih otporne, s izuzetkom da je stanična linija A375 osjetljiva na djelovanje cisplatine.
2. Samo je stanična linija RPMI-7951 izrazito osjetljiva na klinički relevantnu koncentraciju dasatiniba, a u staničnoj liniji A375 primijećena je slaba osjetljivost na istu koncentraciju dasatiniba koja se nije povećavala s povećanjem doze. Kombinacija dasatiniba i svakog od tri istražena protutumorska lijeka u stanicama RPMI-7951 ima antagonistički učinak, a kombinacija dasatiniba i cisplatine u stanicama A375 ima sinergistički učinak.
3. U stanicama RPMI-7951, osjetljivima na izrazito male, klinički relevantne doze dasatiniba, fosforilirani oblik tirozin kinaze Src(Y418) nije njegova meta.
4. Na temelju rezultata dobivenih u modelu 4 stanične linije melanoma zaključujemo da liječenje melanoma kombinacijom dasatiniba i protutumorskih lijekova vinkristina, paklitaksela i cisplatine ne povećava terapijski ishod melanoma osjetljivih na ove spojeve, nego ga upravo suprotno, može i smanjiti. Ovi rezultati naglašavaju potrebu daljnjih istraživanja u cilju otkrivanja biomarkera u stanicama melanoma, a uz čiju bi se pomoć mogla predvidjeti osjetljivost stanica na dasatinib.

7. LITERATURA

- Aguilera DG, Tsimberidou AM (2009). Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Ther Clin Risk Manag* **5**: 281–289.
- Algazi AP, Weber JS, Andrews SC, Urbas P, Munster PN, DeConti RC, *i sur* (2012). Phase I clinical trial of the Src inhibitor dasatinib with dacarbazine in metastatic melanoma. *Br J Cancer* **106**: 85–91.
- Arkenau H-T, Kefford R, Long G V (2011). Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer* **104**: 392–398.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, *i sur* (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* **408**: 297–315.
- Berger W, Hauptmann E, Elbling L, Vetterlein M, Kokoschka EM, Micksche M (1997). Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells. *Int J cancer* **71**: 108–115.
- Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm RA, *i sur* (2001). MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* **69**: 765–773.
- Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M (2010). The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol* **40**: 347–359.
- Buettner R, Mesa T, Vultur A, Lee F, Jove R (2008). Inhibition of Src family kinases with dasatinib blocks migration and invasion of human melanoma cells. *Mol Cancer Res* **6**: 1766–1774.
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* **7**: 3–18.
- Chee CE, Krishnamurthi S, Nock CJ, Meropol NJ, Gibbons J, Fu P, *i sur* (2013). Phase II study of dasatinib (BMS-354825) in patients with metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Oncologist* **18**: 1091–1092.
- Cheng Y, Zhang G, Li G (2013). Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev* **32**: 567–584.
- Chin L (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* **3**: 559–570.
- Chin L, Garraway LA, Fisher DE (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* **20**: 2149–2182.

- Cho YR, Chiang MP (2010). Epidemiology, staging (new system), and prognosis of cutaneous melanoma. *Clin Plast Surg* **37**: 47–53.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, *i sur* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949–954.
- Eustace AJ, Crown J, Clynes M, O'Donovan N (2008). Preclinical evaluation of dasatinib, a potent Src kinase inhibitor, in melanoma cell lines. *J Transl Med* **6**: 53.
- Eustace AJ, Kennedy S, Larkin A-M, Mahgoub T, Tryfonopoulos D, O'Driscoll L, *i sur* (2014). Predictive biomarkers for dasatinib treatment in melanoma. *Oncoscience* **1**: 158–66.
- Fidler (1995). Melanoma Metastasis. *Cancer Control* **2**: 398–404.
- Girotti MR, Pedersen M, Sanchez-Laorden B, Viros A, Turajlic S, Niculescu-Duvaz D, *i sur* (2013). Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signaling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Discov* **3**: 158–167.
- Goodsell DS (2006). The molecular perspective: Cisplatin. *Stem Cells* **24**: 514–515.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674.
- Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, *i sur* (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**: 695–701.
- Homsy J, Cubitt CL, Zhang S, Munster PN, Yu H, Sullivan DM, *i sur* (2009). Src activation in melanoma and Src inhibitors as therapeutic agents in melanoma. *Melanoma Res* **19**: 167–175.
- Huang F, Reeves K, Han X, Fairchild C, Platero S, Wong TW, *i sur* (2007). Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer Res* **67**: 2226–2238.
- Ito F, Chang AE (2013). Cancer immunotherapy: current status and future directions. *Surg Oncol Clin N Am* **22**: 765–783.
- Joo WD, Visintin I, Mor G (2013). Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas* **76**: 308–314.
- Kim LC, Rix U, Haura EB (2010). Dasatinib in solid tumors. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 415–425.
- Klinac D, Gray ES, Millward M, Ziman M (2013). Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring. *Front Oncol* **3**: 54.
- Konecny GE, Glas R, Dering J, Manivong K, Qi J, Finn RS, *i sur* (2009). Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *Br J Cancer* **101**: 1699–1708.

- Korashy HM, Rahman AFMM, Kassem MG (2014). Dasatinib. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* **39**: 205–237.
- Le X-F, Mao W, He G, Claret F-X, Xia W, Ahmed AA, *i sur* (2011). The role of p27(Kip1) in dasatinib-enhanced paclitaxel cytotoxicity in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* **103**: 1403–1422.
- Luke JJ, Hodi FS (2013). Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. *Oncologist* **18**: 717–725.
- Luqmani YA (2005). Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* **14 Suppl 1**: 35–48.
- Mandala M, Massi D (2014). Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch* **464**: 265–281.
- Mangana J, Levesque MP, Karpova MB, Dummer R (2012). Sorafenib in melanoma. *Expert Opin Investig Drugs* **21**: 557–568.
- Marzuka-Alcala A, Gabree MJ, Tsao H (2014). Melanoma susceptibility genes and risk assessment. *Methods Mol Biol* **1102**: 381–393.
- Ortiz R, Melguizo C, Prados J, Alvarez PJ, Caba O, Rodriguez-Serrano F, *i sur* (2012). New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **7**: 297–312.
- Park BJ, Whichard ZL, Corey SJ (2012). Dasatinib synergizes with both cytotoxic and signal transduction inhibitors in heterogeneous breast cancer cell lines--lessons for design of combination targeted therapy. *Cancer Lett* **320**: 104–110.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**: 74–108.
- Pecorino L (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press, Oxford.
- Perez M, Lucena-Cacace A, Marin-Gomez LM, Padillo-Ruiz J, Robles-Frias MJ, Saez C, *i sur* (2016). Dasatinib, a Src inhibitor, sensitizes liver metastatic colorectal carcinoma to oxaliplatin in tumors with high levels of phospho-Src. *Oncotarget* **7**: 33111–33124.
- Shapiro CL, Recht A (2001). Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *N Engl J Med* **344**: 1997–2008.
- Smalley KSM, Herlyn M (2005). Targeting intracellular signaling pathways as a novel strategy in melanoma therapeutics. *Ann N Y Acad Sci* **1059**: 16–25.
- Stojanovic N, Brozovic A, Majhen D, Bosnar MH, Fritz G, Osmak M, *i sur* (2016). Integrin alphavbeta3 expression in tongue squamous carcinoma cells Cal27 confers anticancer drug resistance through loss of pSrc(Y418). *Biochim Biophys Acta* **1863**: 1969–1978.

- Tas F (2012). Metastatic behavior in melanoma: timing, pattern, survival, and influencing factors. *J Oncol* **2012**: 647684.
- Teoh D, Ayeni TA, Rubatt JM, Adams DJ, Grace L, Starr MD, *i sur* (2011). Dasatinib (BMS-35482) has synergistic activity with paclitaxel and carboplatin in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* **121**: 187–192.
- Tokuhisa Y, Lidsky ME, Toshimitsu H, Turley RS, Beasley GM, Ueno T, *i sur* (2014). SRC family kinase inhibition as a novel strategy to augment melphalan-based regional chemotherapy of advanced extremity melanoma. *Ann Surg Oncol* **21**: 1024–1030.
- Trinh VA, Davis JE, Anderson JE, Kim KB (2014). Dabrafenib therapy for advanced melanoma. *Ann Pharmacother* **48**: 519–529.
- Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* **26**: 1131–1155.
- Wang X-D, Reeves K, Luo FR, Xu L-A, Lee F, Clark E, *i sur* (2007). Identification of candidate predictive and surrogate molecular markers for dasatinib in prostate cancer: rationale for patient selection and efficacy monitoring. *Genome Biol* **8**: R255.
- Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, Allison JP, Urba WJ, Robert C, *i sur* (2013). Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci* **1291**: 1–13.
- Wong SJ, Karrison T, Hayes DN, Kies MS, Cullen KJ, Tanvetyanon T, *i sur* (2016). Phase II trial of dasatinib for recurrent or metastatic c-KIT expressing adenoid cystic carcinoma and for nonadenoid cystic malignant salivary tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* **27**: 318–323.
- Xie T, Huang F-J, Aldape KD, Kang S-H, Liu M, Gershenwald JE, *i sur* (2006). Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res* **66**: 3188–3196.
- Yeatman TJ (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* **4**: 470–480.
- Zeng F, Ju R-J, Liu L, Xie H-J, Mu L-M, Zhao Y, *i sur* (2015). Application of functional vincristine plus dasatinib liposomes to deletion of vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* **6**: 36625–36642.
- Zhou J, Giannakakou P (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **5**: 65–71.
- Zhu Z, Liu W, Gotlieb V (2016). The rapidly evolving therapies for advanced melanoma--Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit Rev Oncol Hematol* **99**: 91–99.

Web izvori:

<http://www.abcam.com/pp2-ab120308.html>, pristupljeno 10.12.2016.

<http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types/radiation-therapy/radiation-fact-sheet>, pristupljeno 15.12.2016.

<http://www.cancer.net/cancer-types/melanoma/treatment-options>, pristupljeno 15.12.2016.

<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide/melanoma-skin-cancer-treating-general-info>, pristupljeno 17.12.2016.

<http://www.cancerrxgene.org/>, pristupljeno 13.01.2017.

<http://cenblog.org/the-haystack/files/2012/01/dasatinib.jpg>, pristupljeno 09.12.2016.

<https://clinicaltrials.gov>, pristupljeno 17.01.2017.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/36314>, pristupljeno 11.12.2016.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5978>, pristupljeno 11.12.2016.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=4878>, pristupljeno 11.12.2016.

<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>, pristupljeno 20.12.2016.

8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 20. studenog 1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam u Kutini nakon koje u istom gradu 2007. godine upisujem opću gimnaziju Tina Ujevića. Nakon završenog srednjoškolskog obrazovanja i položene državne mature, 2011. godine upisujem preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Akademski stupanj sveučilišnog prvostupnika biologije stječem 19. rujna 2014. godine izradom završnog rada „*Programirane bakterije koje mogu otkriti signale iz okoliša*“ pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Ivančić Baće na Zavodu za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Iste godine upisujem diplomski sveučilišni studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Tijekom studija boravio sam u okviru laboratorijske stručne prakse na Institutu Ruđer Bošković, u Laboratoriju za molekularnu onkologiju te u Laboratoriju za staničnu biologiju i prijenos signala u kojem sam kasnije pod mentorstvom dr. sc. Andreje Ambriović Ristov započeo izradu diplomskog rada. Osim toga, imao sam priliku volontirati na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, a na završnoj godini diplomskog studija upisao sam Računalni modul na kojem sam upoznat s raznim bioinformatičkim metodama.

Član sam Sekcije za mikrobiologiju Udruge studenata biologije (*BIUS*) koja mi omogućila sudjelovanje na događanjima („Noć biologije“ i „Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković“) s ciljem popularizacije prirodnih znanosti. Tijekom studija imao sam priliku sudjelovati i na simpozijima kao što su Simpozij studenata bioloških usmjerenja (*SiSB*), PMF, Zagreb, (2015.) te 1. Hrvatski simpozij biologa u zdravstvu, PMF, Zagreb, (2015.).

Posjedujem napredno znanje u operativnom sustavu MS Windows te u programskim paketima MS Office i Adobe Photoshop. Uspješno se služim i raznim bioinformatičkim alatima, programskim jezikom R i višekorisničkim operacijskim sustavom UNIX.